



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**AMANDA FERREIRA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO PARA A RECUPERAÇÃO DE RECURSOS  
EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR GRANULAÇÃO AERÓBIA**

**FORTALEZA**

**2022**

AMANDA FERREIRA DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO PARA A RECUPERAÇÃO DE RECURSOS  
EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR GRANULAÇÃO AERÓBIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S233i Santos, Amanda Ferreira dos.  
Influência da fonte de carbono para a recuperação de recursos em sistemas de tratamento de esgoto por granulação aeróbia / Amanda Ferreira dos Santos. – 2022.  
85 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. André Bezerra dos Santos.
1. Recuperação de recursos. 2. Lodo granular aeróbio (LGA). 3. Exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE). 4. Triptofano (Trp). 5. Fonte de carbono. I. Título.

CDD 628

---

AMANDA FERREIRA DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO PARA A RECUPERAÇÃO DE RECURSOS  
EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTO POR GRANULAÇÃO AERÓBIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 06/04/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. André Bezerra dos Santos (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Paulo Igor Milen Firmino  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Roque Passos Piveli  
Universidade de São Paulo (USP)

A Deus.

Aos meus pais, Ana e Eliezer, e à minha irmã,  
Brena.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar com a vida, por me dar a chance de recomeçar e, principalmente, por estar presente nas pequenas coisas.

Aos meus pais, Ana e Eliezer, por todo o apoio nessa jornada, principalmente por não medirem esforços para proporcionar, a mim e a minha irmã, a melhor educação possível.

À minha irmã, Brena, quem me inspira pela sua determinação, pelo amor e pelo cuidado dedicados a mim nos momentos em que mais precisei.

Às amigas Milena e Taynara, por estarem ao meu lado independentemente da situação, sempre me apoiando e me incentivado.

Aos colegas da turma de mestrado, especialmente a Clara, pela parceria nos trabalhos e pelos preciosos ensinamentos.

Aos bolsistas Helena e Vitor, pelo auxílio nas análises físico-químicas desta pesquisa e pela companhia diária no laboratório. A Andréa e a Andreza, pela grande ajuda na extração de DNA das amostras. Ao Igor, por realizar o processamento de dados das análises microbiológicas em tempo recorde. A Nádia, pelo apoio as análises de fluorescência.

Ao Ricardo e a Kamila, pelo apoio, pelos aprendizados diários, pelo incentivo e pela paciência ao longo de todo o mestrado. Sem dúvidas, a parceria com vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. André Bezerra, pelas oportunidades, pelas aulas enriquecedoras e pela orientação nesta dissertação.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, em especial os(as) professores(as) Ana Bárbara, André, Capelo, Fernando, Erlon (*in memoriam*), Marisete, Paulo Igor e Suetônio.

À coordenação da Pós-DEHA, pela acolhida e pelos esclarecimentos prestados.

A todos os amigos, colegas que estiveram comigo e me ajudaram, direta ou indiretamente, a vencer mais esta batalha.

O presente trabalho foi realizado com o apoio das instituições: Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech), Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) e Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) da Universidade Federal do Ceará – UFC; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001; e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Estações Sustentáveis de Tratamento de Esgoto – INCT ETES Sustentáveis.

“Quando a situação for boa, desfrute-a.  
Quando a situação for ruim, transforme-a.  
Quando a situação não puder ser transformada,  
transforme-se.”

(Viktor Frankl)

## RESUMO

A recuperação de recursos produzidos em estações de tratamento de águas residuárias (ETAR) é uma alternativa economicamente sustentável para o gerenciamento do excesso de lodo. Em sistemas de lodo granular aeróbio (LGA), o teor de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) pode alcançar até 40% da biomassa, conferindo ao LGA um grande potencial para recuperar exopolímeros de grande interesse industrial. Sabe-se que exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE) e triptofano (Trp) estão presentes na matriz extracelular de grânulos aeróbios. Entretanto, poucos estudos foram realizados na tentativa de compreender os impactos de parâmetros operacionais sobre a biossíntese desses biopolímeros no lodo. Nesse contexto, este estudo avaliou a influência de diferentes fontes de carbono na produção de ALE e Trp em sistemas LGA, a partir da operação de cinco reatores em batelada sequencial (RBS) com acetato, propionato, glicerol, glicose e sacarose como fontes de substratos. Na presença de acetato encontrou-se uma abundância de bactérias produtoras de SPE e também os maiores teores de biopolímeros ( $418,7 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  e  $4,1 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ). Contudo, foi observada uma desintegração parcial de seus grânulos ao longo da operação. Por outro lado, durante a granulação, resultados animadores na produção de ALE ( $> 250 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) foram obtidos na presença de propionato (R2), significativamente maior que os reatores operados com glicerol, glicose e sacarose. Porém, ao final da operação, os grânulos maduros alimentados com propionato já não produziam a mesma quantidade de ALE, obtendo-se valores da ordem de  $70\text{-}90 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ , próximos aos resultados encontrados nos reatores alimentados com glicerol e sacarose. Em relação à produção de triptofano, além do acetato, propionato e glicerol se mostraram como bons substratos, com teor de  $1,6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ . Os grânulos obtidos com glicose apresentaram os piores resultados em comparação com os demais substratos,  $38,5 \text{ mgALE}\cdot\text{SSV}^{-1}$  e  $0,6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ , possivelmente devido à abundância de microrganismos filamentosos encontrados neste reator. Portanto, a fonte de carbono tem um alto impacto na produção de ALE e Trp.

**Palavras-chave:** Recuperação de recursos. Lodo granular aeróbio (LGA). Substâncias poliméricas extracelulares (SPE). Exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE). Triptofano (Trp). Fonte de carbono.



## ABSTRACT

The recovery of resources produced in wastewater treatment plants (WWTP) is an economically sustainable alternative for managing excess sludge. In aerobic granular sludge (AGS) systems, extracellular polymeric substances (EPS) content can reach up to 40% of the biomass, giving AGS a great potential to recover exopolymers of great industrial interest. It is known that alginate-like exopolymers (ALE) and tryptophan (Trp) are present in the extracellular matrix of aerobic granules. However, few studies have been carried out to understand the impacts of operational parameters on the biosynthesis of these biopolymers in the sludge. In this context, this study evaluated the influence of different carbon sources on ALE and Trp productions in LGA systems by operating five sequential batch reactors (SBR) with acetate, propionate, glycerol, glucose, and sucrose as substrate sources. In the presence of acetate, an abundance of EPS-producing bacteria was found, as well as the highest biopolymers levels ( $418.7 \text{ mgALE}\cdot\text{gVSS}^{-1}$  and  $4.1 \text{ mgTrp}\cdot\text{gVSS}^{-1}$ ). However, a partial disintegration of its granules was observed during the operation. On the other hand, during granulation, encouraging results on ALE production ( $> 250 \text{ mgALE}\cdot\text{gVSS}^{-1}$ ) were obtained with propionate (R2), significantly higher than those found with glycerol, glucose, and sucrose. However, at the experiment completion, the mature granules fed with propionate no longer produced the same amount of ALE, obtaining values of about  $70\text{-}90 \text{ mgALE}\cdot\text{gVSS}^{-1}$ , close to the results found with glycerol and sucrose. Regarding tryptophan production, in addition to acetate, both propionate and glycerol were shown to be good substrates, with a content of  $1.6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ . The granules obtained with glucose showed the worst results compared to the other substrates,  $38.5 \text{ mgALE}\cdot\text{VSS}^{-1}$  and  $0.6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gVSS}^{-1}$ , possibly due to the abundance of filamentous microorganisms found in this reactor. Therefore, the carbon source has a high impact on ALE and Trp production.

**Keywords:** Resource recovery. Aerobic granular sludge (AGS). Extracellular polymeric substances (EPS). Alginate-like exopolymers (ALE). Tryptophan (Trp). Carbon source.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Esquema do processo de granulação aeróbia.....	25
<b>Figura 2</b> – Via biosintética do L-triptofano na <i>E. coli</i> .....	37
<b>Figura 3</b> – Relação $IVL_{30}/IVL_5$ , sólidos suspensos voláteis (SSV) e diâmetro médio dos grânulos ( $\emptyset$ ) nos cinco reatores durante 215 dias de operação. ....	49
<b>Figura 4</b> – Gráficos de matriz de emissão-excitação de fluorescência (FEEM) de SPE extraídas do inóculo e de grânulos aeróbios maduros em pH básico e pH neutro. Os eixos X e Y representam os espectros de emissão (Em) e de excitação (Ex) em nm, respectivamente, e as linhas de contorno representam a intensidade de fluorescência.....	55
<b>Figura 5</b> – Produção de ALE e triptofano ao longo dos 215 dias de operação. ....	58
<b>Figura 6</b> – Variação dos compostos (ALE e Trp), DQO e SPE ao longo do ciclo operacional (6 horas).....	62
<b>Figura 7</b> – Distribuição relativa da diversidade microbiana do lodo ativado de inóculo (I) e do lodo granular aeróbio cultivado em R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose). O gráfico de barras representa apenas os filos com mais de 1% abundância bacteriana total nas amostras. ....	64
<b>Figura 8</b> – Grupos funcionais identificados por família no inóculo e nos sistemas experimentais (abundância absoluta das funções $\geq 10$ ).....	67
<b>Figura 9</b> – Diversidade microbiana relativa a nível de gênero do inóculo (I) e dos reatores. O mapa de calor apresenta os gêneros com mais de 1% de abundância bacteriana total em pelo menos uma das amostras. ....	14

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Comparação entre as principais características de lodo ativado e de lodo granular aeróbio. ....	22
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros operacionais e produção de ALE em LGA. ....	34
<b>Tabela 3</b> – Condições operacionais aplicadas em cada fase do experimento. ....	41
<b>Tabela 4</b> – Solução de micronutrientes (elementos traços). ....	43
<b>Tabela 5</b> – Eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes (N e P) em 215 dias de operação dos reatores R1, R2, R3, R4 e R5. ....	53
<b>Tabela 7</b> – Conteúdo mediano de ALE e triptofano nos reatores em cada fase. ....	61

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ALE	Exopolímeros semelhantes ao alginato, do inglês <i>alginate-like exopolymers</i>
c-di-GMP	Di-guanosina monofosfato cíclico
COV	Carga orgânica volumétrica
DQO	Demanda química de oxigênio
ETAR	Estação de tratamento de águas residuais
GAOs	Organismos acumuladores de glicogênio, do inglês <i>glycogen accumulating organisms</i>
IVL	Índice volumétrico de lodo
LA	Lodo ativado
LGA	Lodo granular aeróbio
OD	Oxigênio dissolvido
PAOs	Organismos acumuladores de fósforo, do inglês <i>phosphate accumulating organisms</i>
PHA	Polihidroxialcanoato
PN	Proteínas
PS	Polissacarídeos
RBS	Reator em batelada sequencial
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
TDH	Tempo de detenção hidráulica
TRC	Tempo de retenção celular (ou idade de lodo)
Trp	Triptofano

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>PERGUNTA DE PESQUISA E HIPÓTESES</b> .....	<b>18</b>
2.1	Perguntas de Pesquisa .....	18
2.2	Hipóteses.....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA DISSERTAÇÃO</b> .....	<b>19</b>
3.1	Objetivo geral .....	19
3.2	Objetivos específicos .....	19
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Caracterização da tecnologia de lodo granular aeróbio</b> .....	<b>20</b>
4.1.1	Processo de granulação aeróbia .....	23
<b>4.2</b>	<b>A matriz de SPE</b> .....	<b>25</b>
4.2.1	<i>Parâmetros operacionais que afetam a produção das SPE</i> .....	26
4.2.1.1	<i>Substratos</i> .....	27
4.2.1.2	<i>Força de cisalhamento</i> .....	27
4.2.1.3	<i>Período feast-famine</i> .....	28
<b>4.3</b>	<b>Recuperação de biopolímeros extracelulares</b> .....	<b>28</b>
4.3.1	<i>Exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE)</i> .....	29
4.3.2	<i>Triptofano (Trp)</i> .....	35
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Configuração do sistema experimental</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>Inóculo de lodo e afluente sintético</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Análises físico-químicas</b> .....	<b>43</b>
5.3.1	<i>Extração, quantificação e caracterização de substâncias poliméricas extracelulares (SPE)</i> .....	44
5.3.2	<i>Extração e quantificação de exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE)</i> .....	44
5.3.3	<i>Extração e quantificação de triptofano (Trp)</i> .....	45
<b>5.4</b>	<b>Análises morfológicas e microbiológicas do lodo</b> .....	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>6.1</b>	<b>Formação e estabilidade dos grânulos aeróbios</b> .....	<b>48</b>
<b>6.2</b>	<b>Desempenho dos reatores</b> .....	<b>50</b>
<b>6.3</b>	<b>Conteúdo de substâncias poliméricas extracelulares (SPE)</b> .....	<b>54</b>

<i>6.3.1 Composição de SPE: análise de espectros de fluorescência 3D-EEM</i> .....	54
<i>6.3.2 Produção de SPE</i> .....	56
<i>6.3.3 Produção de ALE e Trp</i> .....	57
<b>6.4 Produção e consumo de ALE e Trp ao longo do ciclo</b> .....	61
<b>6.5 Caracterização microbiológica: Possíveis grupos microbianos envolvidos na produção de ALE e Trp</b> .....	64
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	18
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	19

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, um dos principais objetivos da comunidade científica tem sido o reaproveitamento e recuperação de recursos, particularmente no que diz respeito ao tratamento de águas residuárias (KARAKAS et al., 2020; ZHANG et al. 2016; GUEST et al., 2009). Essa nova percepção promoveu uma mudança de paradigma, de modo que as estações de tratamento de esgoto (ETE) deixaram de ser vistas unicamente como uma unidade que trata um fluxo de resíduos, e passaram a ser consideradas como potenciais fábricas de recuperação de recursos (FRR) que alimentam a economia circular (KEHREIN et al., 2020). Estima-se que em um futuro próximo, muitas ETEs convencionais serão convertidas nessas FRR (DE CARVALHO et al., 2021). Autoridades da Holanda, por exemplo, atualmente se concentram na recuperação de pelo menos cinco recursos das águas residuárias municipais: celulose, bioplásticos, fosfato, exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE) e biomassa (VAN LEEUWEN et al., 2018).

Um das principais vertentes que tem sido apontado como uma possível fonte de recurso são as substâncias poliméricas extracelulares (SPE), composto complexo formado principalmente de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, ácidos húmicos e lipídeos, sendo a composição dependente das características dos esgotos, lodo de inóculo, assim como das pressões de seleção impostas (LIU et al., 2004). Sua produção está associada grandemente ao tratamento biológico de esgoto, especialmente em lodo granular aeróbio (LGA), tecnologia que tem se destacado cada vez mais, devido sua excelente sedimentabilidade e alta eficiência de remoção de poluentes em relação ao sistema de lodo ativado (BARROS et al., 2020). No sistema LGA, altas taxas de aeração, alternância de condição de abundância (*feast*) e fome (*famine*) contribuem para aumentar a produção de SPE, as quais possuem uma relação direta com a agregação de microrganismos e formação dos grânulos.

A literatura tem mostrado que uma grande fração de SPE do LGA consiste de ALE (LIN et al., 2010). ALE são compostos de açúcares, proteínas e substâncias húmicas, extraídos da matriz extracelular de LGA, identificados pela sua capacidade de formar gel em contato com cátions divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ) e resíduos de ácido urônico (G e M) (LIN et al., 2008; FELZ et al., 2019). Esse biomaterial possui potencial uso nas indústrias de papel, medicina e construção, bem como na agricultura e horticultura (VAN LEEUWEN et al., 2018).

Outro biomaterial relatado como um dos materiais orgânicos dominantes na matriz de SPE de grânulos aeróbios é o triptofano (GUO et al., 2020). Esse composto hidrofóbico é um dos nove aminoácidos essenciais para os humanos. A hidrofobicidade é a principal força motriz da adesão celular, razão pela qual está geralmente presente em LGA (LIU et al., 2004). Além de ter papel fundamental na granulação, o triptofano também possui aplicações na indústria química e farmacêutica (PORTER et al., 2005), alimentícia (FAVERO NETO; GIAQUINTO, 2020) e agricultura (MUSTAFA et al., 2018).

Os pontos estudados até então estão relacionados à proporção de carbono para nitrogênio, o tempo de retenção celular (ROLLEMBERG, et al., 2020a; ROLLEMBERG, et al., 2020b) e os níveis de salinidade (MENG et al., 2019) como parâmetros que desempenham um papel importante para a produção ideal de ALE e triptofano. A fonte de carbono presente no efluente a ser tratado possivelmente possui um efeito significativo na produção desses recursos, levando-se em consideração que já é de conhecimento que esse parâmetro influencia na formação e característica da biomassa do sistema, bem como na composição das SPE (NANCHARAI AH; KUMAR, 2018; ROLLEMBERG et al., 2018; FELZ et al., 2016).

Rollemborg et al. (2020a) e Schambeck et al. (2020), avaliando a presença de ALE em reatores piloto que tratavam águas residuárias municipais, encontraram produção de ALE de  $236 \text{ mgALE} \cdot \text{gSSV}^{-1}$  e  $219 \text{ mgALE} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, Rollemborg et al. (2020b), encontraram em LGA alimentados com acetato, nas melhores condições operacionais (DQO:N = 20), valores da ordem de  $290 \text{ mgALE} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ . Substratos como propionato (YANG et al., 2014) e uma combinação de acetato e glicose (MENG et al., 2019) também já foram utilizados para produção de ALE em grânulos aeróbios, apresentando produções de  $110 \text{ mgALE} \cdot \text{gSSV}^{-1}$  e  $240 \text{ mgALE} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ , respectivamente. No que se refere ao triptofano, há poucos trabalhos que avaliaram sua produção em sistema LGA, com valores de  $48 \text{ mgTrp} \cdot \text{gSSV}^{-1}$  (ROLLEMBERG et al., 2020a) e  $54 \text{ mgTrp} \cdot \text{gSSV}^{-1}$  (ROLLEMBERG et al., 2020b).

Essa diferença de valores encontrado na literatura pode estar fortemente relacionada à fonte de carbono, já que os trabalhos que utilizaram acetato, por exemplo, apresentaram maior teor de recurso nos grânulos do que os estudos que utilizaram esgoto doméstico. Além disso, acetato e propionato são relatados como substratos preferíveis por organismos acumuladores de fósforo (PAOs, do inglês *phosphate accumulating organisms*) e de glicogênio (GAOs, do inglês *glycogen accumulating*



*organisms*) (OEHMEN et al., 2004; SHEN; ZHOU, 2016) e por sua vez há indícios de que a produção de ALE esteja associada ao enriquecimento de PAOs na biomassa (GUIMARÃES, 2017).

Devido à extrema novidade dessas descobertas, poucos estudos foram realizados envolvendo a manipulação de parâmetros operacionais tendo em vista a produção desses recursos de elevado valor agregado. Nesse contexto, um entendimento de como se comporta a produção de ALE e triptofano sistemas LGA operados com diferentes fontes de carbono, é, portanto, necessário para se compreender melhor a dinâmica da produção ao longo das diferentes fases de produção e maturação dos grânulos.

## **2 PERGUNTA DE PESQUISA E HIPÓTESES**

### ***2.1 Perguntas de Pesquisa***

A fonte de carbono adotada em um sistema LGA tem influência sobre a produção de ALE e triptofano?

Dentre os substratos de estudo (acetato, propionato, glicerol, glicose e sacarose), qual exercerá melhor desempenho na produção de ALE e triptofano?

### ***2.2 Hipóteses***

Assim como a fonte de carbono influencia diretamente sobre a formação e estrutura de grânulos aeróbios, ela também interfere na composição da matriz extracelular e, conseqüentemente, na produção de ALE e triptofano.

A produção será variada, mas possivelmente acetato, propionato e glicerol estarão associados a produções de ALE e triptofano mais altas que glicose e sacarose.

### **3 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA DISSERTAÇÃO**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Investigar o impacto da fonte de carbono na produção de exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE) e triptofano (Trp) em sistemas de lodo granular aeróbio (LGA).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o impacto da fonte de carbono na formação, estabilidade, atividade e características físicas de grânulos aeróbios;
- Verificar a produção da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE);
- Analisar o potencial de recuperação de ALE e triptofano a partir da biomassa granular aeróbia;
- Verificar a dinâmica populacional microbiana nos sistemas LGA operados com diferentes fontes de carbono.

**Revisão expandida do artigo:**

DE CARVALHO, C. A.; DOS SANTOS, A. F.; FERREIRA, T. J. T.; LIRA, V. N. S. A.; BARROS, A. R. M.; DOS SANTOS, A. B. Resource recovery in aerobic granular sludge systems: is it feasible or still a long way to go? *Chemosphere*, v. 274, n. 129881, 2021.

#### 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O lodo granular aeróbio (LGA) é uma tecnologia promissora de tratamento de águas residuárias, que tem sido amplamente usada para tratar uma variedade de águas residuárias. O lodo granular pode superar os flocos de lodo em relação à alta retenção de biomassa e à rápida sedimentação, o que permite maior tolerância a choques orgânicos ou toxinas, além de reduzir significativamente a área do sistema de tratamento (GAO et al., 2011; LIM; KIM, 2014). Além disso, o LGA remove simultaneamente DQO, nitrogênio e fósforo, reduzindo a necessidade de adição complementar de produtos químicos para a remoção de fosfato (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). No entanto, como as tecnologias de lodo granular vêm sendo amplamente utilizadas no tratamento de águas residuárias, cada vez mais vem-se gerando maiores quantidades de LGA.

Em comparação com o lodo floculado, uma propriedade notável do lodo granular é um número significativo de substâncias extracelulares (SPE), que formam uma matriz rica em polímeros para os microrganismos a serem incorporados (LIN et al., 2015; MCSWAIN et al., 2005). O conteúdo máximo de SPE pode alcançar até 40% da biomassa do lodo granular (TANG et al., 2011). Proteínas e polissacarídeos são composições dominantes de substâncias extracelulares. Notavelmente, esses componentes de biomateriais extracelulares podem ser aplicados como substitutos para produtos industriais sintéticos, como alginato e triptofano (XUE et al., 2019). Portanto, é atraente recuperar biomateriais de alto valor agregado a partir do lodo granular para suprir a demanda de mercado. Desse modo, o lodo granular oferece grandes oportunidades para a recuperação de biomateriais de alto valor agregado como recursos renováveis, o que pode aumentar fortemente a sustentabilidade e a economia do tratamento de águas residuais.

##### 4.1 Caracterização da tecnologia de lodo granular aeróbio

Há cerca de 25 anos atrás, uma nova forma de lodo ativado foi cultivada em reatores aerados, nomeado de lodo granular aeróbio (BEUN et al., 1999; MORGENROTH et al., 1997). Enquanto os microrganismos formam pequenos agregados irregulares ou flocos

com tamanhos em torno de 50-300  $\mu\text{m}$  em sistemas de lodo ativado convencional (LEMAIRE et al., 2008), sob condições operacionais específicas, agregados maiores, quase esféricos com uma estrutura compacta e densa podem ser formados, constituindo os chamados grânulos aeróbios. Em 2004, durante o *First Aerobic Granule Workshop* (Munique – Alemanha), grânulos aeróbios foram definidos como agregados de origem microbiana, que não coagulam sob cisalhamento hidrodinâmico reduzido, e que posteriormente sedimentam significativamente mais rápido do que flocos de lodo ativado (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007).

Na verdade, o grande tamanho e a estrutura compacta e densa do grânulo aeróbio, resulta em uma excelente capacidade de sedimentação, conforme indicado pela determinação do índice volumétrico de lodo (IVL). Especificamente, uma vez que é um indicador da extensão do espessamento após a sedimentação, a diferença entre os valores de IVL registrados após 5 e 30 min de sedimentação foi usada para diferenciar o lodo granular aeróbio do floco de lodo ativado. Além disso, um tamanho mínimo do grânulo aeróbio de 0,2 mm foi estabelecido como referência. As principais diferenças entre o LGA e o floco de lodo ativado estão apresentadas na Tabela 1.

Como os grânulos aeróbios são autoimobilizados, agregados densos compostos principalmente de bactérias embebidas em substâncias poliméricas extracelulares (SPE), eles podem ser considerados como um caso especial de crescimento de biofilme sem material suporte (BEUN et al., 1999). A estrutura tridimensional do grânulo aeróbio cria gradientes de concentração de oxigênio dissolvido (OD) e substrato ao longo da direção radial, levando à estratificação em camadas de diferentes tipos de microrganismos e metabolismos (LIU et al., 2010). Conseqüentemente, os grânulos aeróbios são geralmente considerados como uma estrutura microbiana em camadas, composta por uma camada externa aeróbia, contendo uma mistura de organismos heterotróficos e autotróficos e um núcleo anóxico ou anaeróbio, onde organismos desnitrificantes e anaeróbios estão presentes (WINKLER et al., 2013). Esses microambientes permitem, assim, a presença de diferentes populações bacterianas, desempenhando papéis específicos na biodegradação de poluentes da água, como organismos acumuladores de fosfato (do inglês, *phosphate accumulating organisms* – PAOs) e organismos acumuladores de glicogênio (do inglês, *glycogen accumulating organisms* – GAOs), bem como bactérias nitrificantes e desnitrificantes (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005).

**Tabela 1** – Comparação entre as principais características de lodo ativado e de lodo granular aeróbio.

<b>Parâmetros</b>	<b>Lodo ativado</b>	<b>Lodo granular aeróbio</b>
<b>Formato</b>	Irregular	Regular e esférico
<b>Tamanho</b>	< 0,2 mm	0,2 – 5,0 mm
<b>Estrutura (camadas)</b>	Não há zonas redox distintas (apenas aeróbio)	Camadas distintas: zonas aeróbias, anaeróbias e anóxicas
<b>Densidade relativa</b>	0,997 – 1,010 (floculento)	1,010 – 1,017 (denso)
<b>Índice volumétrico de lodo (IVL)</b>	IVL <sub>30</sub> > 100 mL/g com IVL <sub>5</sub> ≠ IVL <sub>30</sub>	IVL <sub>30</sub> < 80 mL/g com IVL <sub>5</sub> ≈ IVL <sub>30</sub>
<b>Velocidade de sedimentação</b>	10 – 90 m/h	2 – 10 m/h
<b>SPE</b>	Baixa concentração	Alta concentração
<b>Capacidade de remoção sob cargas orgânicas flutuantes</b>	Remoção ruim	Remoção se mantém em nível estável
<b>Tolerância à compostos tóxicos</b>	Baixa tolerância	Alta tolerância

Fonte: Bengtsson et al. (2018); Nancharaiah e Reddy (2018).

A biomassa granular aeróbia oferece muitas vantagens sobre os sistemas de lodo ativado (ADAV et al., 2008). A boa sedimentação do LGA permite maiores concentrações de biomassa no biorreator e melhor separação sólido-líquido, favorecendo um projeto de reator compacto, que pode ser operado em bateladas sequenciais. Além disso, a alta capacidade de retenção de biomassa aumenta a capacidade de conversão volumétrica, permitindo ao sistema lidar com altas taxas de carga orgânica volumétrica (MASZENAN; LIU; NG, 2011).

No nível microscópico, a estrutura física robusta, compacta e em camadas característica do grânulo aeróbio é importante para fornecer tolerância a altos níveis de toxicidade, bem como a capacidade de suportar grandes variações de carga e águas residuárias de alta recalcitrância, geralmente associadas ao tratamento de efluentes industriais (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000; LIU; TAY, 2004).

Devido à estratificação da população microbiana e à existência simultânea de condições anaeróbias, aeróbias e anóxicas dentro do grânulo aeróbio, a remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo pode ser alcançada em uma única unidade, com altas eficiências (BASSIN et al., 2012; DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). Por conta disso, esse sistema não necessita de vários tanques, tubos e bombas de recirculação, reduzindo significativamente a área e os custos de investimento (CAPEX, do inglês *capital expenditure*)

e operacionais (OPEX, do inglês *operational expenditure*) da estação de tratamento (DE BRUIN et al., 2004).

#### 4.1.1 Processo de granulação aeróbia

A formação de grânulos aeróbios (granulação aeróbia) é um processo físico-químico e biológico complexo. A autoimobilização microbiana é induzida por condições de estresse ambiental, envolvendo cisalhamento físico, interações físico-químicas ou bioquímicas, e mecanismos de atração microbiana (LIU; TAY, 2002). A granulação usando floco de lodo ativado como inóculo é sugerida para se permitir inicialmente a agregação de colônias menores com o intuito de se formar aglomerados densos. Em um segundo momento haverá um crescimento externo e agregação adicional, com colisões entre grânulos, produzindo grânulos densos estáveis e de tamanhos maiores.

Considerando que uma variedade de espécies microbianas é capaz de formar grânulos, a granulação provavelmente depende muito mais das condições de operação do reator, e não da presença de grupos microbianos específicos (BEUN et al., 1999). Tay et al. (2001) sugeriram que o aumento da hidrofobicidade celular e, conseqüentemente, o aumento da interação célula a célula, contribuem para manter as bactérias agregadas firmemente unidas, embora mais pesquisas ainda sejam necessárias para apoiar essa teoria.

Numerosos estudos têm se concentrado na compreensão dos fatores moleculares por trás da formação de grânulos aeróbios, bem como na otimização das condições de operação do reator, promovendo a granulação aeróbia. Até agora, a formação de LGA foi alcançada principalmente em reatores em batelada sequencial (RBS) (SHOW; LEE; TAY, 2012). A operação do RBS consiste basicamente em cinco estágios sucessivos: alimentação, reação, sedimentação, descarte e repouso. As características da operação do RBS, como o regime de alimentação, a regulação controlável do descarte de lodo e as forças de cisalhamento hidráulico uniformes, criam um ambiente ideal para a granulação aeróbia. Por outro lado, a formação de LGA em reatores de fluxo contínuo tem se mostrado difícil de se alcançar (JUANG et al., 2010).

Entre os fatores operacionais relatados para influenciar o processo de granulação em RBS estão a pressão de seleção obtida através da alteração do tempo de sedimentação (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000), a tensão de cisalhamento hidráulica imposta ou velocidades superficiais do ar (LIU; TAY, 2002), alternância de períodos de *feast-famine* (LIU; TAY, 2008), tempo de detenção hidráulica (MUDA et al., 2011), composição do

substrato e carga orgânica volumétrica (GAO et al., 2011), níveis de OD (STURM; IRVINE, 2008), concentração de íons divalentes (ADAV; LEE; TAY, 2008; SHOW; LEE; TAY, 2012), flutuações de pH e temperatura (DE KREUK; PRONK; VAN LOOSDRECHT, 2005) e tipo de inóculo (VERAWATY et al., 2013).

O controle do tempo de sedimentação tem sido destacado entre esses fatores como uma estratégia de pressão de seleção forte e eficaz para acionar a granulação inicial (LIU; TAY, 2004). Com base na taxa de sedimentação mais alta do LGA em comparação com lodo ativado, a imposição de uma velocidade de sedimentação mínima ao se encurtar gradualmente o tempo de sedimentação no RBS (por exemplo, de 30 min para 3 min) tem sido usada como uma estratégia para selecionar agregados de sedimentação rápida sobre lenta, uma vez que estes são eliminados do sistema (BEUN; VAN LOOSDRECHT; HEIJNEN, 2000). Além disso, a inanição aeróbia periódica também foi descrita como um gatilho eficaz para a granulação aeróbia (TAY et al., 2001), possivelmente por induzir a secreção de SPE, com um efeito positivo sugerido na hidrofobicidade da superfície celular (LIU; TAY, 2008; WANG et al., 2006).

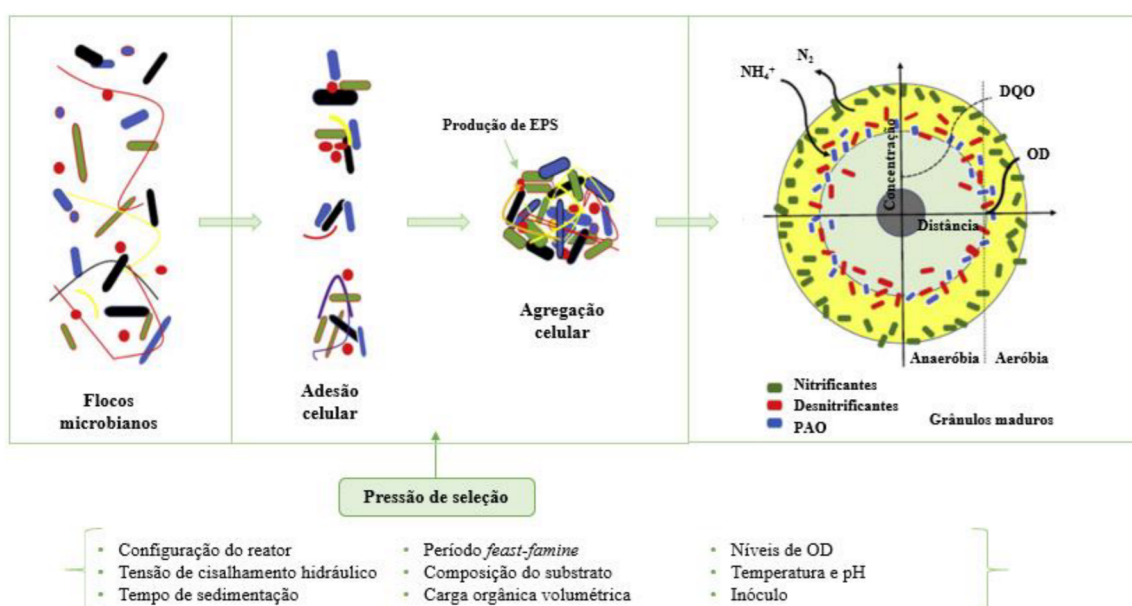
Em relação ao papel da tensão de cisalhamento hidráulica, Beun et al. (1999) descobriram que um nível suficientemente alto de força de cisalhamento hidrodinâmica durante a aeração, juntamente com o estresse de oxigênio (ou seja, uma alta concentração de OD), eram favoráveis para a granulação aeróbia ao usar alimentação aeróbia de águas residuárias contendo DQO facilmente biodegradável. Além de seu papel na formação de grânulos aeróbios através da promoção de colisões inter-partículas, um regime de alta força de cisalhamento foi proposto para induzir a produção de SPE, que é essencial para a formação de grânulos aeróbios (LIU; TAY, 2002; TAY; LIU; LIU, 2001). Os resultados de um estudo com o objetivo de diferenciar os papéis da força de cisalhamento e OD na formação de LGA alimentado aerobiamente, indicou que o OD desempenhava um papel mais significativo do que a força de cisalhamento, uma vez que o grânulo aeróbio não poderia ser formado em níveis de OD abaixo de 5 mg/L, mesmo sob alta força de cisalhamento (STURM; IRVINE, 2008).

Da mesma forma, Mosquera-Corral et al. (2005) não conseguiram atingir uma granulação estável quando a saturação de oxigênio foi reduzida para 40%. Por outro lado, de Kreuk e van Loosdrecht (2004) relataram que a formação de grânulos aeróbios densos também foi possível em baixas concentrações de OD, quando condições de seleção de microrganismos de crescimento lento foram aplicadas. Na verdade, um estudo recente (PRONK et al., 2015) mostrou que a captação anaeróbia de substratos facilmente



biodegradáveis, antes da fase de reação aeróbia, e/ou conversão de substrato por bactérias de crescimento relativamente lento durante o período aeróbio, são condições essenciais para alcançar a granulação estável ao se usar DQO facilmente biodegradável. Neste caso, a seleção de bactérias de crescimento relativamente lento desempenha um papel tão ou mais importante para obter uma granulação eficiente, quando comparadas com a estratégia de seleção baseada no tempo de sedimentação (DE KREUK; HEIJNEN; VAN LOOSDRECHT, 2005). A Figura 1 resume o processo de granulação aeróbia.

**Figura 1** – Esquema do processo de granulação aeróbia.



## 4.2 A matriz de SPE

As SPE são secretadas pelo consórcio bacteriano durante o metabolismo e seu acúmulo ajuda a formar uma ponte entre as células bacterianas e outras partículas em agregados. Desse modo, são dominadas pelos compostos macromoleculares, constituídos principalmente por polissacarídeos (PS), proteínas (PN), glicoconjugados, ácido húmico, ácidos nucleicos etc. (FELZ et al., 2020; FLEMMING; WINGENDER, 2010; GAGLIANO et al., 2018). Na maioria dos estudos, PN total (até 60%) e PS total (40–95%) são demonstrados como os principais constituintes em biopolímeros extracelulares extraíveis (DUBÉ; GUIOT, 2019; MORE et al., 2014). PN é relatada como mais dominante do que PS, com PN/PS de 3-8 (FENG et al., 2019; LOTTI et al., 2019a; MCSWAIN et al., 2005).

Até o momento, muitas contribuições foram dedicadas à identificação de novos

conteúdos de SPE, particularmente em relação a PN, PS e heteropolímeros com funções específicas (BOLEIJ et al., 2019; DE GRAAFF et al., 2019; LOTTI et al., 2019b; WONG et al., 2019; WONG et al., 2020). Por exemplo, substâncias aromáticas semelhantes a PN e triptofano semelhantes a PN foram identificados como mais abundantes na matriz de LGA, contribuindo para o processo de granulação e estabilidade dos grânulos (ZHU et al., 2015).

Quanto aos polissacarídeos, exopolímeros semelhante ao alginato (ALE) foram identificados como formadores de gel funcionais constituintes estruturais da matriz extracelular em sistemas LGA (LIN et al., 2010; SCHAMBECK et al., 2020). Muito recentemente, os glicosaminoglicanos e polissacarídeos sulfatados foram descobertos em produtos de SPE no LGA (FELZ et al., 2020).

A alta diversidade de biopolímeros extracelulares resulta nas complexidades e dificuldades para se avaliar os componentes das SPE. Em particular, o fenômeno de glicosilação, que comumente acontece na matriz do biofilme, dificulta ainda mais o processo analítico. Alguns componentes das SPE não puderam ser efetivamente derivados de acordo com o protocolo de extração tradicional. Mais esforços integrando análises multidisciplinares devem ser dedicados à compreensão de componentes especiais das SPE (funções, propriedades físico-químicas etc., não apenas medindo o teor geral de PN e carboidratos), para melhorar a estabilidade do desempenho da tecnologia de LGA (FELZ et al., 2020; SEVIOUR et al., 2018).

#### ***4.2.1 Parâmetros operacionais que afetam a produção das SPE***

Comunidades microbianas e seu ambiente seletivo são elementos cruciais para regular o comportamento de secreção de SPE, em termos de constituição, estrutura e propriedades físico-químicas dos produtos extraíveis de SPE. A microbiota em diferentes sistemas LGA tem diversas atividades de metabolismo, desencadeando a síntese obviamente distinta e o comportamento de produção de SPE. Sua complexidade torna as informações limitadas sobre os papéis funcionais das comunidades microbianas e microrganismos específicos para conduzir a agregação de células e manter o LGA estável. Contudo, sabe-se que biopolímeros relacionados a PS e PN são componentes predominantes da matriz extracelular, estando as razões PN/PS em um nível alto ( $> 1,0$ ) na maioria dos estudos. Este achado indica que os conteúdos relativamente altos de PN são essenciais para a formação e manutenção de grânulos (MCSWAIN et al., 2005).

#### 4.2.1.1 Substratos

Diferentes substratos influenciam a mudança da comunidade microbiana devido a diversos metabolismos microbianos. Por conseguinte, diferentes tipos de substratos (por exemplo, tamanho molecular e categoria) alimentados aos reatores influenciam o comportamento de secreção de SPE.

A concentração de substratos é outro fator essencial que afeta a produção de SPE ou formas morfológicas de diferentes grânulos. Por exemplo, Long et al. (2015) destacaram que carga orgânica volumétrica (COV) abaixo de  $15 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$  estimulou positivamente a manutenção da estrutura de LGA; enquanto a desintegração do grânulo ocorreu com COV acima de  $18 \text{ kgDQO}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$ . O aumento da COV promoveu o crescimento do núcleo anaeróbio na região interna devido à dimensão granular aumentada e transferência de oxigênio restrita, e ainda resultou na instabilidade do grânulo.

De modo geral, a secreção adequada de biopolímeros extracelulares beneficia a estabilidade do grânulo e o desempenho do sistema; aumentaria a sedimentação dos grânulos e a retenção de biomassa nas unidades de reator. Enquanto as SPE excessivas desencadeiam influências negativas no processo de granulação (ZHANG et al., 2016), ou mesmo causam o colapso dos grânulos (LONG et al., 2015). Não obstante, o comportamento da produção de SPE não deve apenas levar em consideração a quantidade de SPE, mas requer a ligação das propriedades físico-químicas (hidrofobicidade) com a formação e manutenção de grânulos.

#### 4.2.1.2 Força de cisalhamento

A força de cisalhamento hidrodinâmica é um fator essencial que afeta a formação de grânulos (LIU; TAY, 2002) e está intimamente associada à regulação da secreção de SPE bacterianas do lodo granular (FERNÁNDEZ et al., 2014; TAY; LIU; LIU., 2001; WU et al., 2009). Os pesquisadores concluíram que o incremento da força de cisalhamento promove a formação de grânulos (TSUNEDA et al., 2003) e estimula mais a produção de SPE. Porém, a mudança dos componentes das SPE em diferentes grânulos apresenta tendências diferentes. Por exemplo, o incremento da taxa de aeração levou a um aumento do conteúdo de PS, resultando na desintegração dos grânulos (TAY; LIU; LIU., 2001).

#### 4.2.1.3 Período *feast-famine*

Os efeitos do período *famine* (fome ou inanição) no LGA foram amplamente explorados. Conforme acordado, um longo período de inanição leva a uma baixa eficiência do tratamento. No entanto, gera um efeito positivo na granulação microbiana, pois promove a formação e estabilidade dos grânulos. O período de fome está intimamente relacionado à pressão de seleção, às concentrações e aos tipos de substratos fornecidos. Portanto, é difícil avaliar sua contribuição. Por outro lado, o tempo de inanição mais longo parece aumentar o enriquecimento de PN na matriz extracelular (RUSANOWSKA et al., 2019).

Da mesma forma, conforme descoberto por Kang e Yuan (2017), o LGA alimentado com levedura gerou um maior rendimento de SPE com menor COV, embora a desintegração do grânulo tenha sido testemunhada com a carga orgânica mais baixa. Este fenômeno pode ser atribuído ao rápido consumo de substratos dentro de um curto período em uma COV mais baixa, causando um período de fome mais longo para os microrganismos. Nesse caso, provavelmente mais exopolímeros são produzidos por microrganismos, servindo como fonte de carbono e energia para suportar a respiração endógena para sobreviver nas condições de substrato restrito (CORSINO et al., 2017).

No entanto, Campo et al. (2018) defenderam uma visão diferente de que foi principalmente no estágio de *feast* (abundância) que as SPE podem ser absorvidas pelas bactérias como um substrato extra. Isso pode ser devido, por exemplo, a um ambiente extremamente hipersalino, que significa maior demanda de energia para os microrganismos se adaptarem às condições de salinidade.

### 4.3 Recuperação de biopolímeros extracelulares

O excesso de lodo formado durante o tratamento de águas residuárias deve ser gerenciado com segurança para a implementação de práticas sustentáveis. Existem diferentes opções disponíveis para o manuseio do lodo excedente, incluindo a produção e recuperação de produtos de base biológica, como ALE. Dado que a produção de grandes quantidades de lodo granular excedente é inevitável no tratamento de águas residuárias, então a quantidade de polímeros extracelulares aumentará substancialmente caso se alcance uma maior aplicação de tecnologias LGA. Por exemplo, o rendimento de lodo observado em sistemas LGA pode chegar a 0,12–0,14 kgSST·kg<sup>-1</sup> DQO removida (DI IACONI et al. 2010).

Embora o rendimento do LGA diminua em comparação com o lodo ativado

convencional (0,27–0,35 kgSST·kg<sup>-1</sup> DQO removida), devido ao metabolismo endógeno e aos elevados requisitos de manutenção, a quantidade de LGA residual ainda é grande nas estações de tratamento (FOLADORI; ANDREOTTOLA; ZIGLIO, 2010). Projetos de sistemas de LGA para o tratamento de águas residuárias de 308 mil habitantes em termos de equivalente populacional (com base em uma ETAR em Utrecht, Holanda) simularam uma produção de aproximadamente 3,4 toneladas de polímeros extracelulares diariamente (KEHREIN et al., 2020). Portanto, um grande número de recursos com a forma de polímeros extracelulares existe no lodo granular excedente e sua obtenção seria de grande valor para a recuperação de biomateriais. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar a produção e as aplicações dos biopolímeros extracelulares do LGA e para determinar a economia da extração e a viabilidade comercial de produtos de base biológica do LGA.

#### **4.3.1 Exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE)**

Os alginatos são polissacarídeos formados por várias proporções de dois monômeros: ácidos  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G) (LIN et al., 2010). Principalmente devido à sua capacidade de formar géis em contato com cátions divalentes (como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ ), pode ser usado como um espessante nas indústrias de alimentos e têxteis, como um agente gelificante para encapsulamento de medicamentos e produção de curativos e como um filme-agente formador para preservação de alimentos e fabricação de papel (CAO et al., 2020; MORADALI et al., 2018). Nas últimas décadas, o uso do alginato em aplicações farmacêuticas e biomédicas avançadas foi investigado devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade e atividade biológica versátil (SZEKALSKA et al., 2016).

Sua produção comercial é exclusivamente a partir de gêneros de algas marrons, como *Ascophyllum*, *Laminaria* e *Macrocystis*, que são encontradas estritamente em regiões costeiras da América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (GAO et al., 2018; MCHUGH, 2003). A produção anual é estimada em cerca de 30 mil toneladas, com valores de mercado variando entre US\$ 80 e 140 por quilo (MURUJEW et al., 2019).

Embora não seja comercialmente competitivo, a produção de alginato pelas bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* em condições controladas também é viável, gerando polímeros com características uniformes e composições específicas (REMMINGHORST; REHM, 2006).

A matriz extracelular do LGA contém ALE, que também forma gel na presença de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e resíduos de ácido urônico (G e M) (LIN et al., 2008). No entanto, sua

composição específica ainda não foi elucidada. Com base no espectro FT-IR (espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier), alguns estudos sugerem que a ALE é basicamente composta por polissacarídeos (LIN et al., 2010). Outras pesquisas propõem que na verdade consiste em um complexo polimérico, com polissacarídeos e proteínas, além do próprio alginato (KARAKAS et al., 2020; MENG et al., 2019; VAN LEEUWEN et al., 2018). Portanto, análises espectroscópicas complementares, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia Raman e espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), são necessárias para elucidar em mais detalhes a estrutura da ALE produzida nos sistemas LGA.

No entanto, uma vez que cerca de 15-25% do peso seco dos grânulos aeróbios é feito de ALE, sua recuperação do excesso de LGA é uma alternativa promissora para a produção deste recurso de alto valor agregado (FELZ et al., 2016). Alguns estudos já demonstraram o potencial da ALE como um material de revestimento para aumentar a resistência do papel à água (LIN et al., 2015) e como um biossorvente para a adsorção de corante e fósforo (LADNORG et al., 2019). A ALE também pode ser aplicada na agricultura devido à sua capacidade de reter água, reduzindo a lixiviação de fertilizantes e melhorando sua absorção pelas lavouras. Para a construção civil, a ALE pode ser usada como revestimento para pisos de concreto (VAN LEEUWEN et al., 2018; KAUMERA, 2020).

Já existem iniciativas que permitem a recuperação sustentável de ALE a partir de sistemas LGA em escala plena. A iniciativa público-privada *National Alginate Research Program* (NAOP) foi criada na Holanda para investigar e desenvolver uma maneira economicamente viável de extrair ALE de lodo de ETARs que adotam a tecnologia Nereda® (VAN DER ROEST et al., 2015). Em 2019, a primeira planta de extração de ALE para o LGA excedente de um sistema Nereda® começou a operar em Zutphen, Holanda (DUTCHWATER SEC, 2020). Testes de campo revelaram que 18 kg de ALE puderam ser produzidos a partir de 80 kg de LGA (22,5% de recuperação), demonstrando o alto potencial de recuperação de alginato mesmo em reatores em escala plena (VAN LEEUWEN et al., 2018). Conforme mencionado anteriormente, uma segunda fábrica foi construída em Epe, Holanda, em 2019, e iniciou a operação em dezembro de 2020. A fábrica da EPE foi projetada para produzir 50 toneladas de Kaumera por ano, na qual a produção será aumentada de acordo com a demanda do mercado até um limite de 100 toneladas de Kaumera por ano (DUTCHWATER SEC, 2020). A fábrica de Zutphen tem uma capacidade muito maior e foi projetada para produzir até 400 toneladas de Kaumera por ano.

#### 4.3.1.1 Parâmetros operacionais relacionados à produção ALE em sistemas LGA

Embora até o presente existam poucos estudos publicados sobre os impactos das condições de operação dos sistemas LGA na biossíntese de ALE, os principais parâmetros operacionais são discutidos a seguir e listados na Tabela 2.

**a) Taxa de carregamento orgânico (TCO):** foi relatado que a variação rápida da taxa de carregamento orgânico (TCO), entre 4,4, 5,2, 8,7 e 17,4 kg DQO·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup> (1250, 1500, 2500 e 5000 mg DQO·L<sup>-1</sup> no reator, respectivamente), influenciou a produção de ALE por LGA (YANG et al., 2014). Os experimentos foram conduzidos em dois RBSs com diferentes estratégias de alimentação: RC (TCO foi variado somente após 30 dias de operação) e RS (TCO foi variado durante os primeiros 50 dias de operação). Em ambos os sistemas, os picos de ALE e di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) coincidiram com os choques de carregamento orgânico. Os autores sugerem que o rápido aumento da DQO afluyente estimulou a liberação de c-di-GMP pela comunidade microbiana, o que desencadearia a biossíntese de ALE.

**b) Relação de carbono para nitrogênio (C:N):** três RBSs foram operados sob diferentes composições de razão: R9 (DQO:N = 10; 500 mg DQO·L<sup>-1</sup>); R10 (DQO:N = 20; 1000 mg DQO·L<sup>-1</sup>) e R11 (DQO:N = 30; 1500 mg DQO·L<sup>-1</sup>) (ROLLEMBERG et al., 2020b). R9 (243,6 mgALE·gSSV<sup>-1</sup>) e R10 (289,7 mgALE·gSSV<sup>-1</sup>) mostraram diferenças estatisticamente significativas no conteúdo de ALE ( $p \approx 0,04$ ), indicando que as razões C:N afluentes impactam diretamente a síntese de ALE. No entanto, em R11, o conteúdo de ALE foi reduzido (236,6 mg ALE·gSSV<sup>-1</sup>). Sistemas LGA sujeitos a altas razões DQO:N (ou alto TCO) geralmente possuem uma abundância de organismos filamentosos de sedimentação lenta, que causam instabilidade operacional, conforme apontado pelos autores.

**c) Salinidade:** há um relato sobre a produção de ALE em sistemas LGA alimentados com diferentes concentrações de NaCl (R1: 0 gNaCl·L<sup>-1</sup>; R2: 10 gNaCl·L<sup>-1</sup>; R3: 30 gNaCl·L<sup>-1</sup>) (MENG et al., 2019). R2 teve os maiores rendimentos de ALE (R1: 26,8 mgALE·gSSV<sup>-1</sup>; R2: 49,8 mgALE·gSSV<sup>-1</sup>; R3: 28,9 mgALE·gSSV<sup>-1</sup>). Os autores sugeriram que uma salinidade moderada (em torno de 1% NaCl, cerca de 10.000 mg/L) desencadeava a expressão do gene AlgC em *Pseudomonas*, ativando a enzima fosfomanomutase, que faz parte do mecanismo de biossíntese do alginato (MORADALI et al., 2018). Sob estresse osmótico excessivo, entretanto, a ativação dessa enzima era inibida.

**d) Tamanho do grânulo:** o maior conteúdo de ALE foi correlacionado com grânulos de elevado tamanho dominando o sistema (diâmetro entre 400 e 600  $\mu\text{m}$ ) após a granulação ser alcançada (SCHAMBECK et al., 2020). Resultados semelhantes foram relatados em um estudo realizado com 5 RBSs com diferentes configurações de ciclo. Um conteúdo de ALE geralmente maior e mais estável foi observado em grânulos maduros (R1:  $225,6 \pm 19,5 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R2:  $234,1 \pm 13,4 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R3:  $251,7 \pm 16,8 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R4:  $250,8 \pm 24,2 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R5:  $241,3 \pm 22,6 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) quando comparado com grânulos ainda em formação (R1:  $213,7 \pm 46,6 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R2:  $232,0 \pm 51,7 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R3 :  $238,1 \pm 49,4 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R4:  $227,4 \pm 51,7 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ; R5:  $190,3 \pm 43,8 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) (ROLLEMBERG et al., 2020b).

**e) Tempo de retenção celular (TRC):** um TRC de 20 dias reduziu o conteúdo de ALE ( $203,9 \pm 27,8 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) quando comparado aos sistemas LGA operados com TRC de 10 ( $237,5 \pm 11,8 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) e 15 dias ( $244,1 \pm 15,2 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) ou sem controle de TRC (ROLLEMBERG et al., 2020b). Possíveis explicações para tais achados são a maior taxa de respiração endógena para TRCs longos, o que induziria o consumo de SPE como fonte de carbono, ou o fato de que uma redução do TRC poderia beneficiar o crescimento de PAOs, permitindo uma maior produção de ALE (ROLLEMBERG et al., 2020b).

#### *4.3.1.2 Associação de produção de ALE com remoção de fósforo*

Um estudo mostrou que os maiores rendimentos de ALE estão associados a aumentos significativos na eficiência de remoção de fósforo em sistemas LGA (MENG et al., 2019). Outra pesquisa com LGA encontrou uma correlação positiva entre o conteúdo de ALE na fase de maturação (ou seja, pós-granulação) e a remoção de matéria orgânica, amônia e fósforo (SCHAMBECK et al., 2020). No mesmo estudo, a presença de PAOs também foi observada após a granulação, quando a síntese de ALE era maior. Portanto, vários autores recomendaram a realização de mais estudos aprofundados para avaliar a relação entre a remoção de fósforo e a produção de ALE (ROLLEMBERG et al., 2020a; SCHAMBECK et al., 2020; WANG et al., 2017).

Também há evidências de que a maior remoção de fósforo observada em grânulos ricos em ALE está relacionada à precipitação de estruvita e não à remoção biológica do fósforo pelos PAOs. Um estudo mostrou que a ALE extraída de grânulos aeróbios foi capaz de



induzir a formação de estruvita e precipitados semelhantes a este último composto, no qual o íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) é substituído por íons como potássio ( $\text{K}^+$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (LIN; BASSIN; VAN LOOSDRECHT, 2012). No experimento, enquanto o fósforo acumulado na biomassa foi de  $93 \text{ mgPT} \cdot \text{gSST}^{-1}$ , o fósforo acumulado na forma de precipitados do tipo estruvita atingiu  $72 \text{ mgPT} \cdot \text{gSST}^{-1}$ . Além disso, sob uma concentração de amônia de  $10,4 \text{ mgN} \cdot \text{L}^{-1}$ , a ALE foi responsável por 60% da adsorção de amônia na forma de estruvita. Assim, o cultivo de grânulos com alto teor de ALE pode ser uma alternativa para alcançar altas remoções de N e P.

**Tabela 2** – Parâmetros operacionais e produção de ALE em LGA.

Configuração do reator	Fonte de carbono	Ciclo operacional	Aeração	DQO:N	Idade de lodo	Remoção de matéria orgânica e nutrientes	Produção de ALE	Referência
Escala laboratorial Volume: 4,78 L Troca volumétrica: 57,9%	Efluente sintético: ácido propiônico (1250-5000 mg·L <sup>-1</sup> )	Alimentação: 6 min Aeróbio: 208-223 min Sedimentação: 20-5 min Descarte: 6 min	Taxa de aeração: 8 L·min <sup>-1</sup> Velocidade ascensional: 2,7 cm·s <sup>-1</sup>	6-25	-	DQO: 95%	0,11 g·gSSV <sup>-1</sup>	YANG et al. (2014)
Escala laboratorial Volume: 2,75 L Troca volumétrica: 54,5%	Efluente sintético: acetato de sódio	Alimentação anaeróbia: 60 min Aeróbio: 112-115 min Sedimentação: 5-3 min Descarte: 5 min	Taxa de aeração: 4 L·min <sup>-1</sup> OD: 2,5 mg·L <sup>-1</sup>	-	-	DQO: 89%	0,16 g·gSSV <sup>-1</sup>	WANG et al. (2017)
Escala laboratorial Volume: 2 L Troca volumétrica: 50%	Efluente sintético: glicose + acetato de sódio (600 mg·L <sup>-1</sup> )	Alimentação: 2 min Anaeróbio: 30 min Aeróbio: 199 min Sedimentação: 4 min Descarte: 2 min Repouso: 3 min	Taxa de aeração: 3,0 L·min <sup>-1</sup> OD: 7-9 mg·L <sup>-1</sup>	6	20 dias	DQO: 90% NT: 99% PT: 78%	0,24 g·gSSV <sup>-1</sup>	MENG et al. (2019)
Escala piloto Volume: 140 L Troca volumétrica: 40-60%	Efluente doméstico (460 mg·L <sup>-1</sup> )	Alimentação: 1 min Anaeróbio: 60 min Aeróbio: 240-280 min Sedimentação: 55-15 min Descarte: 1 min Repouso: 3 min	OD: 2-4 mg·L <sup>-1</sup>	11	12 dias	DQO: 95%	0,21 g·gSSV <sup>-1</sup>	ROLLEMBERG et al. (2020a)
Escala laboratorial Volume: 7,6 L Troca volumétrica: 50%	Efluente sintético: acetato de sódio (500 mg·L <sup>-1</sup> )	Alimentação anaeróbia: 60 min Anaeróbio: 60 min Aeróbio: 210-225 min Anóxico: 10 min Sedimentação: 20-5 min Descarte: 1 min	Velocidade ascensional: 1,2 cm·s <sup>-1</sup> OD: 1-3 mg·L <sup>-1</sup>	10	10 dias	DQO: 90% NT: 90% PT: 75%	0,23 g·gSSV <sup>-1</sup>	ROLLEMBERG et al. (2020b)
Escala piloto Volume: 110 L Troca volumétrica: 50%	Efluente doméstico (513 mg·L <sup>-1</sup> )	Alimentação anaeróbia: 60 min Aeróbio: 234 min Anóxico: 30 min Sedimentação: 30 min Descarte: 6 min	OD: sem controle	11	15 dias	DQO: 80% NT: 73% PT: 33%	0,24 g·gSSV <sup>-1</sup>	SCHAMBECK et al., (2020)

Legenda: NT: nitrogênio total; PT: fósforo total.

#### *4.3.1.3 Métodos de extração para recuperação de ALE*

Os métodos de extração para recuperação de SPE e ALE são bem relatados na literatura, embora sejam geralmente considerados de elevado custo. Felz et al. (2016) afirmam que, devido à estrutura complexa das SPE, é praticamente impossível extrair todos os seus componentes por um único método. Portanto, os métodos selecionados influenciarão tanto a composição quanto os rendimentos dos polímeros recuperados. Esses autores compararam seis diferentes metodologias de extração de SPE, usando uma amostra de lodo coletada de um reator Nereda® em escala piloto.

Apenas o método de extração alcalina com carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) em altas temperaturas formou uma matriz gelatinosa, mostrando-se a técnica mais adequada para recuperação de ALE. Amplamente utilizado como metodologia em pesquisa científica (KARAKAS et al., 2020; LIN et al., 2010; MENG et al., 2019; ROLLEMBERG et al., 2020b; SCHAMBECK et al., 2020; YANG et al., 2014), esse processo é semelhante à extração de alginato de algas marrons e é baseado nas propriedades de solubilidade desse composto.

Primeiro, os sais de alginato insolúveis são convertidos em alginato de sódio solúvel pela adição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Então o ácido algínico é precipitado por ajustes de pH e coletado. Finalmente, o ácido é novamente convertido em alginato de sódio pela adição de uma mistura de álcool e água, na qual o sal de sódio não se dissolve (MCHUGH, 2003).

Um processo semelhante é utilizado em plantas Nereda® para extrair o Kaumera do excesso de lodo (TOUR KAUMERA NEREDA GUM, 2020). Inicialmente, é realizada uma etapa de adensamento do LGA, normalmente por gravidade, seguido de homogeneização em um tanque tampão; na sequência, o LGA passa por um espessante de correia, onde ocorre a adição de um polímero. Por fim, o LGA mais concentrado é aquecido até 80°C, onde o pH é aumentado com a adição de hidróxido, separando a ALE do lodo. Em sequência, o licor misto é resfriado e centrifugado, e o sobrenadante é acidificado para que a ALE possa flocular como um gel, sendo finalmente separada por uma nova centrifugação.

#### *4.3.2 Triptofano (Trp)*

O L-triptofano (Trp) é um dos nove aminoácidos essenciais aos humanos, sendo também essencial para animais, plantas e algumas bactérias (MUSTAFA et al., 2018). Na indústria de alimentos, é utilizado para preservação de alimentos devido às suas propriedades antioxidantes (HUVAERE; SKIBSTED, 2009) e como suplemento na alimentação animal

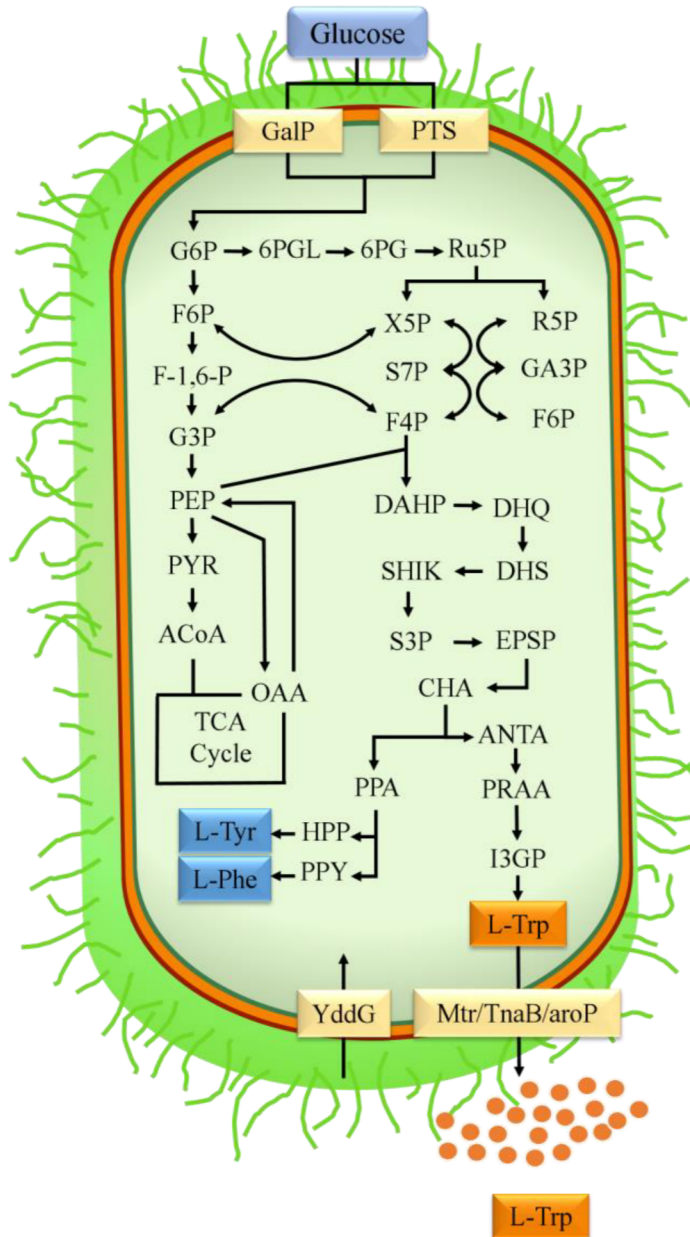
(FAVERO NETO; GIAQUINTO, 2020). Também pode ser aplicado como medicamento, pois promove bons resultados no tratamento de doenças psicológicas como depressão (PORTER et al., 2005), ansiedade (VAN VEEN et al., 2009) e distúrbios do sono (SANGSOPHA et al., 2019). Além disso, sua aplicação exógena, que pode ser por meio de pulverização foliar, preparação de sementes ou aplicação no solo, foi relatada como altamente significativa para o crescimento e desenvolvimento normal da planta (MUSTAFA et al., 2018). Recentemente, seu valor comercial foi relatado em cerca de US\$ 80-120 por quilograma (ROLLEMBERG et al., 2020b).

Este composto pode ser produzido por três métodos: 1) síntese química a partir do indol; 2) síntese bioquímica, em que a enzima triptofanase é produzida por bactérias, isolada e posteriormente utilizada para a produção de triptofano a partir de indol, piruvato e amônia; e 3) fermentação microbiana, em que bactérias capazes de sintetizar triptofanase produzem triptofano diretamente, utilizando outros substratos, como glicose e xilose, além dos mencionados anteriormente (LIU et al., 2019; 2009; SANO; KONOSUKE; MITSUGI, 1975; SNYDER; SMITH, 1944; WATANABE; SNELL, 1972).

O método de fermentação microbiana emprega principalmente as espécies *Corynebacterium glutamicum* e *Escherichia coli*, esta última com as vantagens de ser facilmente manipulada geneticamente e crescer rapidamente em meios baratos (NIU et al., 2019). Em *E. coli*, o transporte de glicose para o interior da célula é realizado principalmente por meio do sistema de glicose fosfotransferase (PTS). No entanto, o sistema de transporte de galactose também pode ser realizado, em que a enzima galactose permease (Gal P) é usada. Ambos os sistemas consomem fosfoenolpiruvato (PEP), que juntamente com a eritrose-4-fosfato (E4P), é considerado um precursor crítico da produção de triptofano (LIU et al., 2019). Depois que o substrato entra na célula, a produção de triptofano continua dentro dela, como mostrado esquematicamente na Figura 2.

Recentemente, foi relatado que LGA pode produzir triptofano, que está associado à porção de proteína das SPE (LI et al., 2019; LI et al., 2020; ZHANG et al., 2018a). Um estudo mostrou que, entre os compostos analisados, o triptofano foi um dos materiais orgânicos dominantes na matriz de SPE de grânulos aeróbios (GUO et al., 2020). Hamza et al. (2018) e He et al. (2020) também relatam a presença de triptofano em grânulos aeróbios. Foi obtida uma produção de triptofano de 0,048 gTrp·gSSV<sup>-1</sup> em um LGA em escala piloto (ROLLEMBERG et al., 2020a).

**Figura 2** – Via biosintética do L-triptofano na *E. coli*.



*G6P*: glicose-6-fosfato, *F6P*: fructose-6-fosfato, *F1-6P*: fructose-1,6-bisfosfato, *G3P*: gliceraldeído-3-fosfato, *6PGL*: 6-fosfogluconolactona, *6PG*: 6-fosfogluconato, *2D3D6PG*: 2-desidro-3-desoxi-d-gluconato-6-fosfato, *RU5P*: ribulose-5-fosfato, *X5P* xilulose-5-fosfato, *R5P*: ribose-5-fosfato, *S7P*: sedoheptulose-7-fosfato, *E4P*: eritrose-4-fosfato, *PEP*: fosfoenolpiruvato, *PYR*: piruvato, *ACoA*: acetilcoenzima A, *OAA*: ácido oxaloacético, *DAHP*: 3-desoxi-d-arabinoeptulosanato-7-fosfato, *DHQ*: 3-desidroquitano, *DHS*: 3-desidros hikimato, *SHIK*: shikimato, *S3P*: shikimato-3-fosfato, *SPEP*: 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato, *CHA*: corismato, *PPA*: pré-fenato, *HPP*: 4-hidroxifenilpiruvato, *PPY*: fenilpiruvato, *ANTA*: antranilato, *PRAA*: *N*-(5-fosforribosil)-antranilato, *CPADRP*: 1-(*o*-carboxifenilamina)-1'-deoxiribulose 5'-fosfato, *I3GP*: (1*S*,2*R*)-1-C-(indol-3-*la*)-glicerol-3-fosfato), *L-Phe*: L-fenilalanina, *L-Tyr*: L-tirosina, *L-Trp*: L-triptofano.

#### 4.3.1.4 Parâmetros operacionais relacionados à produção de triptofano em sistemas LGA

Embora os estudos publicados ainda sejam escassos, já existem algumas evidências de como a operação do RBS com lodo granular aeróbio pode influenciar a produção de triptofano. Por exemplo, em reatores em que a operação favorece o desenvolvimento de grânulos com um grupo microbiano diverso e estrutura compacta, é possível observar uma maior concentração deste aminoácido (LUO et al., 2014; XIAO; ZHOU, 2020). Quando os sistemas granulares são desestabilizados, levando à formação de uma biomassa flocular, a concentração de triptofano tende a diminuir (HAMZA et al., 2018). A seguir, estão os principais parâmetros operacionais associados à produção de triptofano em sistemas LGA que foram identificados pelos pesquisadores até agora.

**a) Relação carbono para nitrogênio:** uma razão DQO:N de 30 foi relatada em diminuir os rendimentos de triptofano ( $37,9 \pm 22,7 \text{ mgTrp} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ ) comparando-se reatores LGA operados sob razões DQO:N de 10 e 20 ( $51,8 \pm 5,3$  e  $54,1 \pm 8,0 \text{ mgTrp} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ , respectivamente) (ROLLEMBERG et al., 2020b). Uma maior produção de triptofano também foi observada em um reator operado com uma razão C:N de 7,5 em comparação a razões C:N de 15 e 30 (YU et al., 2020). Quando a razão C:N foi gradualmente reduzida de 15 para 5, o conteúdo de triptofano no LGA aumentou, enquanto a produção de triptofano no reator operado sob C:N de 15 foi relativamente constante (ZHANG et al., 2018a). Quando a relação DQO:N é menor que 5, maior é a presença de proteínas e menor é o número de polissacarídeos na matriz de SPE. Tal desequilíbrio pode levar à quebra do grânulo e retorno da biomassa ao estado de floco, embora uma diminuição na concentração de triptofano não tenha sido encontrada (LUO et al., 2014). Em resumo, uma relação C:N próxima a 5 parece ser ideal para a produção de triptofano para garantir também a estabilidade dos sistemas LGA.

O acúmulo de triptofano observado em relações C:N mais baixas foi associado a uma seleção positiva dos gêneros *Thauera* e *Paracoccus*, que estão positivamente relacionados à sua produção (ZHANG et al., 2018a). Esses organismos, principalmente os *Thauera*, estão relacionados à melhora da capacidade de desnitrificação por serem mais abundantes nos núcleos dos grânulos, juntamente com os gêneros *Nitrosomonas* e *Leadbetterella*. Por outro lado, também estão associados a uma redução da capacidade de nitrificação (ZHANG et al., 2018a). Portanto, é possível que estratégias operacionais que promovem a produção de triptofano afetem a remoção de nitrogênio em sistemas LGA.

**b) Tamanho do grânulo:** um conteúdo mais baixo de triptofano foi observado em grânulos maduros (R1:  $48,1 \pm 2,1$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R2:  $46,6 \pm 2$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R3:  $50,4 \pm 2,8$ ; mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R4:  $49,8 \pm 4,3$  mg·g SSV<sup>-1</sup>; R5:  $34,5 \pm 5,7$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>) em comparação com grânulos ainda em formação (R1:  $58,9 \pm 13,8$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R2:  $60,8 \pm 14,2$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R3:  $63,5 \pm 13,5$ ; mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R4:  $62,9 \pm 16,7$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>; R5:  $56,2 \pm 15,8$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>) (ROLLEMBERG et al., 2020b). Esses achados são reforçados por estudos que relatam um aumento na abundância relativa de *Thauera* sp. durante os estágios iniciais de formação de grânulos aeróbios, seguido por uma diminuição após a maturação (HAMZA et al., 2018), uma vez que esses microrganismos foram associados à produção de triptofano (ZHANG et al., 2018a).

**c) Tempo de retenção celular (TRC):** foi relatado que em um TRC de aproximadamente 6 dias, a formação de triptofano era aumentada em LGA, enquanto em um SRT de 12 dias, uma diminuição da produção era observada (ZHANG et al., 2018b). Além disso, os sistemas LGA operados com TRC de 10, 15 ou 20 dias não mostraram diferença estatística entre os rendimentos de triptofano ( $58,3 \pm 4,6$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>,  $52,9 \pm 5,7$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup> e  $48,1 \pm 7,0$  mgTrp·gSSV<sup>-1</sup>, respectivamente) (ROLLEMBERG et al., 2020b). O aumento da produção de triptofano parece estar relacionado à formação de grânulos maiores de estrutura mais compacta, que ocorre em menores TRC (ZHANG et al., 2018b) devido à maior secreção de SPE e seu menor consumo durante o período de fome (*famine*).

#### 4.3.1.5 Associação da produção de triptofano com mecanismos de detecção de quórum

Há evidências de que os mecanismos *quorum sensing* (QS) podem ser explorados para estimular a produção de SPE e triptofano. Especula-se que as moléculas de N-acil homoserina lactonas (AHL) formadas por cadeias de 8 carbonos, como 3OH-C8-homoserina lactona (3OH-C8-HSL), podem promover a secreção de triptofano e substâncias semelhantes a proteínas a partir da biomassa granular (ZHANG et al., 2018b, 2020).

#### 4.3.1.6 Métodos de extração para recuperação de triptofano

Em relação aos métodos de recuperação do triptofano de LGA, ainda não existem processos amplamente utilizados, dada a escassez de estudos publicados. Dentre os métodos de extração, destacam-se as técnicas térmicas, que consistem na solubilização de proteínas

pela exposição do lodo a elevadas temperaturas por tempo suficiente para promover as reações químicas necessárias (HARRIS; MCCABE, 2015; YANG et al., 2014).

Quanto à quantificação do triptofano, é possível realizá-la visualmente por meio de uma matriz tridimensional de excitação-emissão (3D-EEM) (GUO et al., 2020; TU et al., 2012). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) também pode ser utilizada, servindo também para purificar o triptofano extraído por ser um processo que separa as moléculas pela sua polaridade e hidrofobicidade (OPITECK et al., 1998; ROLLEMBERG et al., 2020a).



## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Configuração do sistema experimental

O sistema experimental foi conduzido em cinco reatores em batelada sequencial (RBS) de configuração convencional e sob condições operacionais similares, mudando apenas a fonte de carbono do afluente. Os reatores foram confeccionados em acrílico com volume útil de 7,6 L e dimensões de 100 cm de altura e 10 cm de diâmetro interno, com uma relação altura/diâmetro (H/D) de 10. Toda a investigação foi realizada no Laboratório de Saneamento (Labosan) do Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

O experimento consistiu em três fases: fase I (30 dias), fase II (35 dias) e fase III (150 dias). Em cada fase, ocorreram as alterações descritas na Tabela 3. Os RBSs foram operados a temperatura ambiente de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com ciclo dividido em alimentação anaeróbia, reação (períodos anaeróbio e aeróbio), sedimentação e descarte, com duração total de 6 horas.

**Tabela 3** – Condições operacionais aplicadas em cada fase do experimento.

Fase	Duração (dias)	DQO (mg·L <sup>-1</sup> )	Ciclo operacional					TDH (h)	Troca vol. (%)
			Alim. anaer. (min)	Período anaer. (min)	Aeração (min)	Sed. (min)	Descarte (min)		
I	10	750	20	100	390	30	< 1	36	25%
	20	750	20	100	220	20	< 1	24	25%
II	35	750	40	80	230	10	< 1	12	50%
III	150	1000	20	100	225	5	< 1	12	50%

A mistura do lodo durante o período anaeróbio foi realizada a partir de pulsos de aeração de 1 min a cada hora. A aeração foi fornecida por meio de compressor de ar (ACO-003, Sunsun, China) com taxa de aeração de  $10,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , resultando em uma velocidade ascensional do ar de  $1,2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ . A duração do período de sedimentação foi reduzida gradativamente de 30 min para 20 min (fase I), em seguida, para 10 min (fase II) e 5 min (fase III), sendo o tempo excedente adicionado ao período aeróbio.

Inicialmente, o tempo de detenção hidráulica (TDH) foi de 24 horas com uma relação de troca volumétrica de 25% na fase I (aclimatação), sendo alterados para 12 horas e 50%, respectivamente, nas fases seguintes. A carga orgânica volumétrica (COV) aplicada foi aumentada gradualmente ao longo das fases, de  $0,5$  a  $2,0 \text{ gDQO}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$ . Essas modificações

nos sistemas experimentais foram adotadas como estratégia para aclimatar o lodo e estimular o processo de granulação aeróbia (LIU et al., 2005). Neste estudo, o tempo de retenção celular (TRC) não foi controlado.

## 5.2 Inóculo de lodo e afluente sintético

O inóculo foi coletado de um sistema de lodo ativado do tipo carrossel para tratamento de esgoto doméstico localizado em Fortaleza, Ceará, Brasil. Aproximadamente 3,8 L desse lodo foi introduzido em cada reator, com uma concentração inicial de sólidos suspensos voláteis (SSV) de  $1,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e índice volumétrico de lodo em 30 min (IVL<sub>30</sub>) de  $418 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$  durante a partida.

As fontes de carbono testadas no experimento foram: acetato (R1), propionato (R2), glicerol (R3), glicose (R4) e sacarose (R5). Acetato e propionato favorecem às populações de PAOs, as quais já foram associadas a maiores produções de ALE (GUIMARÃES, 2017). Além de ser relatado como capaz de sustentar populações ricas em PAOs, o glicerol é citado como um dos melhores substratos para produção de alginato em culturas puras (BORGOS et al., 2013; GIMMESTAD et al., 2004; MALEKI et al., 2017). Glicose e sacarose foram escolhidas para investigar se impactariam a produção de ALE tão negativamente quanto impactam a produção de alginato bacteriano em culturas puras (BORGOS et al., 2013). Além disso, é possível que glicerol, glicose e sacarose sejam substratos que estimulem a produção de triptofano, visto que esses substratos podem gerar o PEP (fosfoenolpiruvato) como intermediário metabólico, o qual é consumido durante a produção de triptofano por microrganismos (NIU et al., 2019).

A solução de alimentação foi preparada utilizando água potável, fonte de carbono, meio basal (solução de macro e micronutrientes) e tampão. A composição da água residual sintética na fase final foi:  $1000 \text{ mgDQO}\cdot\text{L}^{-1}$  (fonte de carbono),  $50 \text{ mgNH}_4^+\cdot\text{N}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ),  $10 \text{ mgPO}_4^{3-}\cdot\text{P}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ),  $2 \text{ mgCa}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),  $5 \text{ mgMg}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e  $1 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de solução de micronutrientes detalhada na Tabela 4. Nas fases I e II, a concentração de DQO foi de  $750 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , também mantendo a relação C:N de 20, considerada como favorável para produção de ALE (ROLLEMBERG et al., 2020a). A fim de manter o pH neutro, a solução de alimentação foi tamponada com  $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ).

**Tabela 4** – Solução de micronutrientes (elementos traços).

Nutriente	Concentração (mg·L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2720
ZnCl <sub>2</sub>	50
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	500
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	38
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	90
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2000
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	92
NaSeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	162
EDTA	1000

Fonte: dos Santos et al. (2005).

### 5.3 Análises físico-químicas

O desempenho dos sistemas foi avaliado em termos de remoção de matéria orgânica e nutrientes, de acordo com as seguintes análises em amostras de afluente e efluente: DQO, nitrogênio na forma de amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), e fósforo na forma de fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P). O nitrogênio total (NT) foi considerado como a soma das frações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Todas análises foram realizadas duas vezes por semana seguindo as metodologias descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012). O monitoramento de oxigênio dissolvido (OD), mantido em torno 2 a 4 mg·L<sup>-1</sup>, e pH em amostras de licor misto foi medido semanalmente pelo uso de sonda (YSI 5000, YSI Inc., EUA).

A caracterização físico-química da biomassa foi realizada semanalmente a partir das análises de concentração de sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) e do índice volumétrico do lodo em 5 e 30 min (IVL<sub>5</sub> e IVL<sub>30</sub>, respectivamente) de acordo com APHA (2012).

A seguir, serão descritas as metodologias de extração e quantificação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE) e triptofano (Trp). Todas essas análises foram realizadas duas vezes por semana.

### ***5.3.1 Extração, quantificação e caracterização de substâncias poliméricas extracelulares (SPE)***

As SPE foram extraídas por um método de extração de calor modificado proposto por Yang et al. (2014). Na extração, 5 mL do licor misto coletado na fase aeróbia foram alcalinizados com 5 mL de NaOH 1 M, aquecidos em banho-maria a 80°C por 30 minutos e colocados em ultrassom a 55 Hz por 5 minutos (Cristófoli Biossegurança, Brasil). Após a extração, a amostra foi filtrada com membrana de 0,45 µm (Millipore, USA) e diluída em água Milli-Q (Millipore, USA) na proporção de 1:2.

O conteúdo de proteína (PN) foi determinado pelo método de Lowry modificado, enquanto o conteúdo de polissacarídeos (PS) foi analisado usando um método de ácido sulfúrico-fenol (LONG et al., 2014). O total de SPE foi considerado como a soma de PN e PS, sendo os resultados obtidos em termos de mg de PS, PN ou SPE por g de SSV.

A análise das propriedades fluorescentes de SPE foi realizada conforme descrito em Lin et al. (2021), com adaptações. Foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência (Shimadzu, RF-6000, Japão) localizado no Laboratório de Bioinorgânica (LABIO) do Departamento de Química da UFC. O espectro de fluorescência tridimensional da matriz de excitação-emissão (3D-EEM) foi obtido em faixas de comprimento de onda de excitação (Ex) de 200–550 nm e de emissão (Em) de 220–600 nm. Os incrementos de varredura de Ex e Em foram de 5 e 2 nm respectivamente, com fendas de 5 nm. Foram preparadas duas alíquotas da solução de SPE extraída com diluição de 1:10 em pH básico e em pH neutro das amostras de inóculo e de lodo granular coletado no final da operação para a leitura no equipamento.

### ***5.3.2 Extração e quantificação de exopolímeros semelhantes ao alginato (ALE)***

O método descrito por Lin et al. (2010) foi modificado e usado para extrair o ALE do lodo granular aeróbio. 50 mL de uma alíquota de licor misto foi centrifugada a 3850 × g por 20 min, na qual o sobrenadante foi descartado. Após isso, a amostra foi liofilizada por cerca de 24 h (Freeze Dryer L 101, Liotop, Brasil).

À biomassa seca, adicionaram-se 0,71 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 100 mL de água Mili-Q. Esta suspensão foi aquecida em banho-maria a 80 °C, sob agitação de 400 rpm, por 30 min para a liberação de ALE no meio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3850 × g por 20 min, na qual o sobrenadante foi coletado. O ALE foi precipitado pela adição de HCl 4 M ao se ajustar o pH entre 2,0 e 2,5. A solução foi centrifugada, obtendo-se o ALE na forma ácida

como precipitado, que foi então congelado, liofilizado e pesado. O valor da massa foi expresso seguindo as recomendações de Felz et al. (2016).

### **5.3.3 Extração e quantificação de triptofano (Trp)**

O pH das alíquotas de SPE foi ajustado para 6,5–7,5 com HCl 4 M, contabilizando a quantidade adicionada de ácido para calcular a diluição. Para dopagem da amostra, adicionou-se 50 ppm da solução de triptofano na proporção de 1:1, de modo que contivesse uma concentração mínima de 25 ppm de triptofano. O conteúdo de Trp foi então medido por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC CTO-20A, Shimadzu Corporation, Japão), considerando trabalhos anteriores (WANG et al., 2014; PELTRE et al., 2017). O HPLC foi equipado com uma coluna Hypersil BDSC-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 mm), UV 280 nm e detector UV/VIS (volume de injeção 20 µL, corrida de 6 min, eluição isocrática). A fase móvel foi composta de metanol e água a proporção molar de 3:10, com taxa de fluxo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. A concentração de triptofano é dada pela diferença entre as áreas dos picos de leitura da amostra dopada e da água Mili-Q dopada (branco).

## **5.4 Análises morfológicas e microbiológicas do lodo**

A formação e o desenvolvimento dos grânulos foram avaliados por granulometria (peneiramento e gravimetria), combinada com microscopia óptica semanalmente. A análise de granulometria foi realizada semanalmente utilizando três peneiras com abertura de 0,2 mm, 0,6, mm e 1,0 mm. A porcentagem de grânulos maiores que a abertura da peneira foi calculada pela relação entre a massa de grânulos que passou pela peneira e a massa total da amostra. O reator atinge o estágio de granulação aeróbia somente quando mais de 80% da biomassa apresenta diâmetro maior que 0,2 mm (DE KREUK; KISHIDA; VAN LOOSDRECHT, 2007). A determinação do diâmetro médio do grânulo foi feita a partir de imagens de microscópio óptico (Opton) tratadas no software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, USA).

As análises de biologia molecular para identificação dos microrganismos presentes no lodo ocorreram a partir das seguintes etapas: extração do DNA, sequenciamento de *amplicons* no gene 16S rRNA e processamento de dados. 0,5 g (peso total úmido) de amostras do inóculo e do licor misto coletado durante a aeração no final da operação tiveram o DNA extraído por meio do kit de isolamento de DNA PowerSoil® (MoBio Laboratories Inc.,

EUA) seguindo as orientações do fabricante.

O sequenciamento de *amplicons*, baseado no gene 16S rRNA região V4, foi preparada conforme Illumina (2013), usando *primers* específicos (515F/806R). Após a indexação, os produtos da PCR (*amplicons*) foram purificados usando Agencourt AMPure XP-PCR *purification beads* (Beckman Coulter, Fisher Scientific, EUA), conforme manual do produto, e quantificados usando kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA) em um fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, EUA). Os *amplicons* foram sequenciados usando o kit de reagentes 300-cycle MiSeq chemistry (Illumina, EUA) com o sequenciador de desktop MiSeq (Illumina, EUA) localizado na Central de Genômica e Bioinformática (CeGenBio) da UFC.

Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados com ferramentas de bioinformática. As leituras de sequenciamento foram trimadas, montadas e tratadas para remoção de ruídos usando o pacote DADA2 v1.20.0 (CALLAHAN et al., 2016). Após a remoção de ruídos, as sequências representativas são chamadas de variantes de sequenciamento de amplicon, ou ASVs (do inglês, *Amplicon Sequencing Variants*). As ASVs resultantes foram classificadas taxonomicamente usando o classificador IDTAXA (MURALI; BHARGAVA; WRIGHT, 2016), do pacote DECIPHER v2.20.0 (WRIGHT, 2016), baseado na versão 138 do banco de dados de rRNA SILVA (QUASTET al., 2013).

Um filtro de prevalência foi aplicado em todo o conjunto de dados, excluindo os filos encontrados em apenas uma das amostras. As abundâncias absolutas das funções foram preditas com PICRUST2 (DOUGLAS et al., 2020). Os códigos KEGG Orthology para as funções de interesse foram obtidos por busca de palavras-chave com a ferramenta KEEGEST v1.32.0 (KEGGREST, 2021), resultando nos seguintes códigos: K10944, K10945, K10946, K10535, K05601 e K15864 para bactérias oxidadoras de amônia (AOB) ; K00370 e K00371 para bactérias oxidadoras de nitrito (NOB); K20932, K20933, K20934 e K20935 para bactérias anaeróbias oxidadoras de amônia (ANAMMOX); K20812, K00975, K00688 e K02438 para organismos acumuladores de glicogênio (GAO); K00937 e K22468 para organismos acumuladores de fósforo (PAO); e K00372, K00360, K00367, K00370, K00371, K00373, K00374 e K10534 para bactérias desnitrificantes (DNB). Os pacotes DADA2, DECIPHER e KEEGEST, do projeto Bioconductor (HUBER et al., 2015), foram rodados em R, versão 4.1.2.

## 5.5 Análises estatísticas

Foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney para comparar o desempenho dos reatores. Os resultados dos testes foram avaliados de acordo com o valor de  $p$ . Se  $p \leq 0,05$ , a hipótese nula é rejeitada, ou seja, os grupos de dados são considerados estatisticamente diferentes.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Formação e estabilidade dos grânulos aeróbios

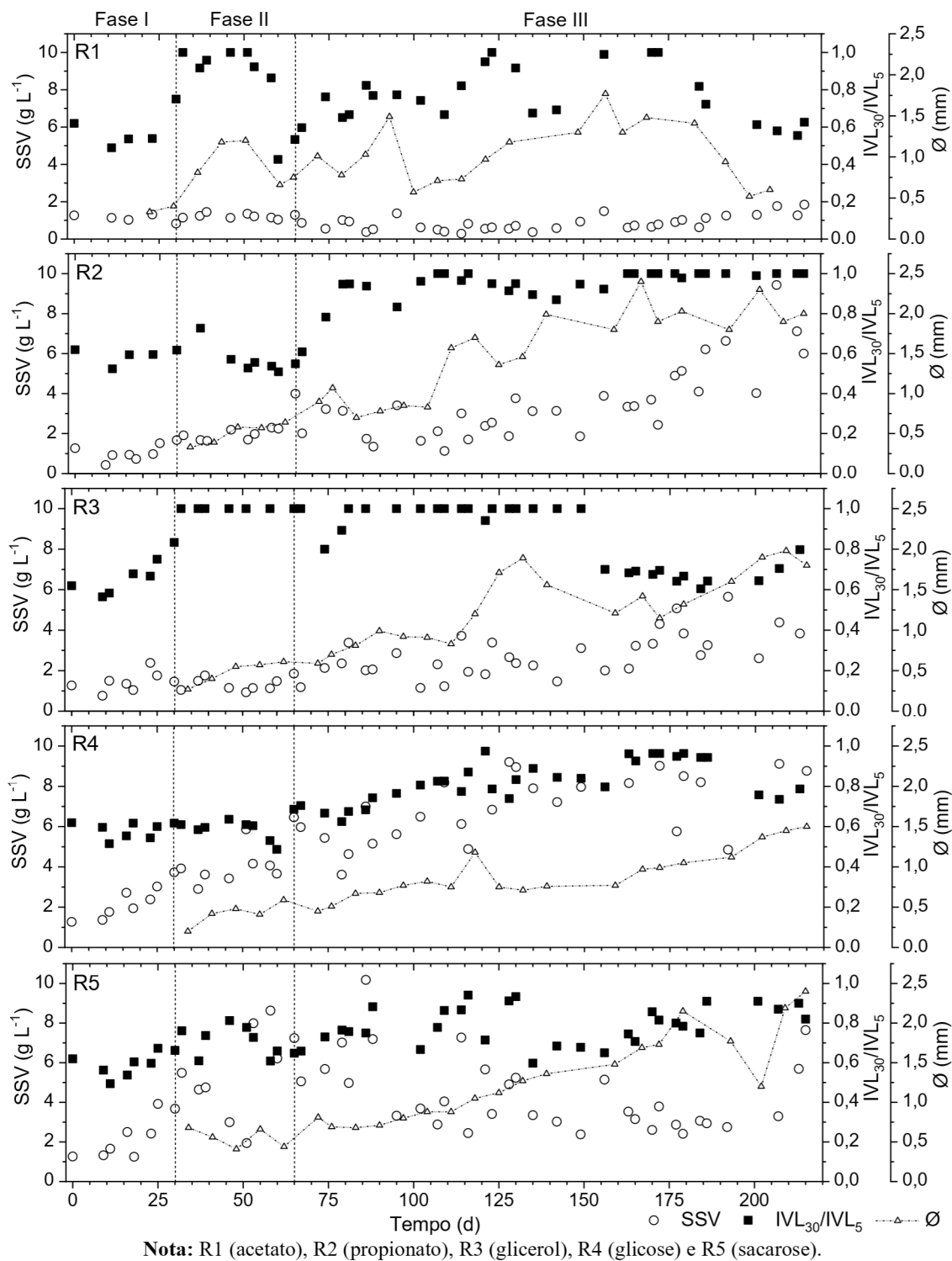
A Figura 3 mostra os resultados de SSV, relação  $IVL_{30}/IVL_5$  e diâmetro médio dos grânulos ao longo da operação. Como pode ser observado, os cinco sistemas experimentais foram inoculados com lodo ativado com concentração de SSV de  $1,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e relação  $IVL_{30}/IVL_5$  de 0,62. Após uma semana da partida, uma redução da concentração inicial de SSV foi observada em R1, R2 e R3, pois a biomassa floculenta foi lavada dos sistemas. Diferentemente, R4 e R5 já haviam recuperado a quantidade de biomassa perdida nesse período, indicando uma melhor capacidade inicial de retenção de biomassa. Com a aplicação das condições operacionais (Tabela 3), todos os reatores apresentaram melhoria na sedimentabilidade (relação  $IVL_{30}/IVL_5$ ) durante a fase I (aclimatação).

A formação dos grânulos ocorreu em momentos distintos. Em R1, R2 e R3, a granulação aeróbia ocorreu entre as fases I e II, em torno de 20-25 dias após partida. Por outro lado, em R4, a granulação foi atingida apenas no final da fase II, com cerca de 60 dias de operação. A granulação tardia em R4 pode ser explicada pelo fato de, ao ser hidrolisada, a glicose tem seus produtos consumidos preferencialmente por bactérias filamentosas dispersas no meio líquido, que comprometem a sedimentação do lodo e dificultam a formação do grânulo (DE KREUK et al., 2010; DU et al., 2011). Para o reator R5 alimentado com sacarose, foi observada a formação de grânulos por volta de 25 dias de operação. No final da fase II, foi observada a presença de mais de 90% de grânulos aeróbios acima de 0,2 mm em cada sistema.

Entre as mudanças de fase, houve uma perda de sólidos em todos os sistemas devido à redução do tempo de sedimentação de 20 min para 10 min (fase II) e de 10 min para 5 min (fase III), acompanhada de melhoria na sedimentabilidade do lodo, que é um comportamento típico do lodo granular. Durante a fase II, todos os reatores conseguiram reter uma maior quantidade de biomassa, principalmente R4 e R5, ao mesmo tempo que aumentaram a relação  $IVL_{30}/IVL_5$ , especialmente em R1 e R3, cujo valor atingiu próximo de 1,0.



**Figura 3** – Relação  $IVL_{30}/IVL_5$ , sólidos suspensos voláteis (SSV) e diâmetro médio dos grânulos ( $\emptyset$ ) nos cinco reatores durante 215 dias de operação.



Durante a fase III, R1 (acetato) manteve a concentração de SSV, chegando ao fim da operação com valores médios da ordem de  $1,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , e relação  $IVL_{30}/IVL_5$  instável, em

média de 0,74. Por volta dos dias 100 e 155 de operação, esse reator apresentou momentos de instabilidade com perda de biomassa, seguidos de redução do tamanho médio do grânulo, refletindo também na queda da relação  $IVL_{30}/IVL_5$ . O comportamento de R1 pode ser justificado possivelmente pela formação de grânulos frágeis, facilmente desintegrados ao longo da operação, devido aos seguintes mecanismos: (a) tamanho crítico do grânulo formado com este tipo de substrato, com até 1,5 mm; (b) entupimento de poros do grânulo pela produção excessiva de SPE; (c) crescimento de microrganismos filamentosos (VERAWATY et al., 2013; CORSINO et al., 2016; QIULAI et al., 2019).

Diferentemente, R2, R3, R4 e R5 alcançaram concentrações médias de SSV entre 3,0 a 7,0  $g \cdot L^{-1}$  e  $IVL_{30}/IVL_5$  em torno de 0,80, indicando uma alta retenção de biomassa e boa sedimentabilidade. Em R2 (propionato), a concentração de SSV foi crescente durante a maturação, em média de 3,62  $g \cdot L^{-1}$ , bem como o diâmetro médio de seus grânulos, variando entre 1,0 e 2,5 mm, além destes se mostrarem estáveis quanto à sedimentabilidade, com relação  $IVL_{30}/IVL_5$  próxima de 1,0. O reator alimentado com glicerol (R3) também apresentou concentração de SSV crescente na fase final (3,0  $g \cdot L^{-1}$ ). Contudo, a sedimentabilidade da biomassa foi afetada por volta do 150º dia pelo aumento da taxa de aeração, que fragmentou os grânulos, ocasionando também perda de biomassa (HE et al., 2018).

Em resposta ao aumento da concentração de SSV em R2, R3, R4 e R5, um elevado tempo de retenção celular (TRC) foi alcançado na fase III (28–37 dias). Por outro lado, R1 manteve um TRC entre 4 e 7 dias durante todo período experimental, possivelmente devido às instabilidades do sistema e à perda de biomassa.

Assim como reporta a literatura, também foi encontrado que a glicose (R4) é um substrato que favoreceu a elevada retenção de biomassa (7,30  $g \cdot L^{-1}$ ) com boa sedimentabilidade ( $IVL_{30}/IVL_5 \sim 0,80$ ) se comparado com as outras fontes de carbono, como o acetato (R1) (LIU et al., 2005; HE et al., 2018). A sacarose (R5) também favoreceu a formação de grânulos densos, capazes de se manterem no reator ( $SSV = 4,73 g \cdot L^{-1}$ ), mas com sedimentabilidade razoável. Neste estudo, foi identificada a presença de microrganismos filamentosos a partir do 130º dia de operação, prejudicando a sedimentação do lodo.

## 6.2 Desempenho dos reatores

O desempenho dos reatores foi monitorado por um período de 215 dias (Tabela 5). Foi alcançada uma elevada eficiência de remoção de DQO em todos os reatores (> 90%).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os sistemas ( $p = 0,25$ ), indicando que o tipo de substrato não interferiu na remoção de matéria orgânica.

Em todos os sistemas, foi observada uma melhoria da eficiência de remoção de nitrogênio total (NT) entre as fases experimentais. À medida que os grânulos se desenvolvem em tamanho, cria-se um ambiente favorável, com condições aeróbias e anóxicas/anaeróbias, dentro do próprio grânulo que possibilite a coexistência de bactérias nitrificantes e desnitrificantes (CHEN et al., 2011). Na fase final, a remoção de NT encontrada variou entre 72 a 78% nos reatores. Embora tenha sido observada uma queda da nitrificação entre fases devido à síntese da biomassa que consome amônia em seu metabolismo, a eficiência de nitrificação foi elevada durante todo o período de operação ( $> 80\%$ ), indicando que as bactérias nitrificantes oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB) mantiveram-se estáveis nos reatores (LASHKARIZADEH et al., 2015). Pelas análises estatísticas, a remoção de NT foi significativamente diferente entre os sistemas ( $p < 0,05$ ).

Em R1 (acetato), durante os períodos de desintegração dos grânulos, houve uma redução na eficiência de remoção de amônia, variando entre 15 a 30%, possivelmente devido à perda de bactérias nitrificantes que estavam presentes nos grânulos desintegrados (WINKLER et al., 2011), embora, em poucos dias depois, o desempenho tenha sido restaurado. O acetato é relatado como um bom doador de elétrons, o que justifica sua boa eficiência na conversão de nitrogênio ( $\sim 78\%$ ) (ADAV et al., 2010).

O desempenho de R2 (propionato) em relação à remoção de NT se mostrou ligeiramente inferior aos demais reatores, atingindo valores médios de 70% ao longo a operação. Neste reator, foi observado um maior acúmulo de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), em torno de  $13 \text{ mgNO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ , quando comparado aos demais sistemas, indicando uma deficiência na desnitrificação.

O reator R3 (glicerol) apresentou comportamento de remoção de NT similar à R2, com acúmulo de nitrato no sistema ao longo da operação. Sugere-se que, além do rápido consumo de DQO no período anaeróbio, a elevada concentração de OD na fase aeróbia ( $2-4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) pode ter favorecido à nitrificação em detrimento à desnitrificação durante o período aeróbio de fome (*famine*), resultando no acúmulo de nitrato no reator (DI BELLA; TORREGROSSA, 2013).

Os reatores R4 (glicose) e R5 (sacarose) obtiveram uma eficiência de remoção de NT em torno de 75% e, portanto, superior ao desempenho de R2 e R3. Provavelmente esses sistemas se adaptaram melhor à elevada concentração de OD durante a fase aeróbia ( $2-4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) por conta da complexidade desses substratos, que demandam uma maior taxa de

oxigênio para degradá-los, interferindo menos na atividade das bactérias desnitrificantes.

Em relação à remoção de fósforo total (PT), a eficiência também melhorou ao longo da operação em todos os reatores, alcançando médias de 49 a 72% na última fase. Os testes estatísticos apontaram para diferenças significativas nas remoções de PT entre os sistemas ( $p < 0,05$ ). Uma possível explicação que justifica o baixo desempenho na remoção de fósforo nos sistemas experimentais é a alto tempo de retenção celular (TRC), entre 28 e 37 dias na fase final. Sem o descarte controlado do lodo, os organismos acumuladores de fosfato (PAOs) saturados permanecem no sistema, interferindo na remoção de fósforo (BASSIN et al., 2012). Por outro lado, embora o tempo de retenção celular de R1 tenha sido baixo (entre 4 a 7 dias) devido à contínua perda de lodo no sistema, a eficiência de remoção de fósforo se manteve em torno de 50%, provavelmente devido à competição entre PAOs e GAOs (organismos acumuladores de glicogênio) (CARVALHEIRA et al., 2014).

**Tabela 5** – Eficiência de remoção de matéria orgânica e nutrientes (N e P) em 215 dias de operação dos reatores R1, R2, R3, R4 e R5.

Reator Etapa	R1 (acetato)			R2 (propionato)			R3 (glicerol)			R4 (glicose)			R5 (sacarose)				
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III		
DQO	Afluente	606	856	838	695	1028	893	703	802	855	615	778	880	710	870	903	
	(mg·L <sup>-1</sup> )	(196)	(185)	(180)	(125)	(222)	(203)	(138)	(152)	(142)	(97)	(114)	(171)	(92)	(136)	(178)	
	Efluente	24	62	36	42	71	32	30	80	34	39	41	36	26	61	36	
(mg·L <sup>-1</sup> )	(8)	(44)	(25)	(16)	(41)	(29)	(15)	(46)	(25)	(27)	(37)	(34)	(14)	(44)	(27)		
<b>Remoção (%)</b>	<b>95 (2)</b>	<b>92 (5)</b>	<b>96 (3)</b>	<b>94 (3)</b>	<b>92 (6)</b>	<b>96 (3)</b>	<b>96 (2)</b>	<b>96 (3)</b>	<b>91 (5)</b>	<b>96 (3)</b>	<b>93 (4)</b>	<b>95 (4)</b>	<b>95 (3)</b>	<b>96 (2)</b>	<b>93 (5)</b>	<b>96 (3)</b>	
Frações de nitrogênio	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> afluente	49,8	49,8	51,7	54,9	51,6	52,1	44,7	50,5	51,7	46,7	45,7	47,4	53,6	51,3	48,4	
	(mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N·L <sup>-1</sup> )	(8,1)	(7,5)	(9,4)	(6,2)	(9,3)	(9,1)	(5,1)	(5,9)	(7,6)	(4,2)	(4,8)	(8,4)	(2,7)	(5,5)	(6,8)	
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> efluente	1,4	4,2	3,2	6,3	3,7	1,1	1,6	2,7	3,0	0,7	3,9	3,4	0,9	6,0	7,3	
	(mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N·L <sup>-1</sup> )	(0,5)	(2,8)	(2,9)	(1,0)	(1,0)	(0,5)	(1,0)	(1,1)	(1,1)	(0,3)	(2,6)	(2,4)	(0,5)	(2,0)	(4,4)	
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> efluente	1,3	3,2	2,1	1,5	0,9	0,5	1,5	1,1	1,1	0,5	1,5	0,8	0,8	1,9	1,3	0,8
	(mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N·L <sup>-1</sup> )	(0,1)	(1,8)	(1,6)	(0,1)	(0,1)	(0,1)	(0,4)	(0,5)	(0,5)	(0,7)	(0,3)	(0,2)	(0,3)	(0,4)	(0,5)	(0,3)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> efluente	17,5	7,2	7,0	18,2	14,4	11,5	10,8	10,9	11,2	11,2	10,9	9,4	8,6	13,6	8,7	4,4	
(mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N·L <sup>-1</sup> )	(2,5)	(1,2)	(3,3)	(3,1)	(3,1)	(2,6)	(1,9)	(2,1)	(2,8)	(2,8)	(3,2)	(3,0)	(2,7)	(3,0)	(2,8)	(2,0)	
<b>Remoção (%)</b>	<b>59 (4)</b>	<b>69 (7)</b>	<b>78 (10)</b>	<b>53 (6)</b>	<b>64 (12)</b>	<b>74 (9)</b>	<b>68 (11)</b>	<b>72 (9)</b>	<b>71 (10)</b>	<b>72 (9)</b>	<b>67 (5)</b>	<b>70 (10)</b>	<b>74 (10)</b>	<b>69 (10)</b>	<b>70 (11)</b>	<b>72 (11)</b>	
Fósforo	Afluente	11,4	9,8	11,2	11,6	10,8	11,2	11,2	9,7	10,1	9,1	7,4	11,0	9,7	7,4	10,3	
	(mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P·L <sup>-1</sup> )	(1,7)	(3,0)	(2,6)	(1,5)	(2,9)	(2,6)	(2,6)	(2,6)	(2,5)	(1,7)	(2,7)	(2,0)	(2,2)	(2,5)	(3,2)	
	Efluente	8,2	6,3	5,5	7,9	7,0	6,2	6,2	6,0	4,9	4,9	3,6	3,8	5,8	3,9	3,1	
(mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P·L <sup>-1</sup> )	(1,5)	(1,8)	(1,0)	(1,9)	(1,9)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,5)	(1,9)	(1,5)	(1,4)	(1,9)	(1,3)	(1,0)	
<b>Remoção (%)</b>	<b>27 (14)</b>	<b>34 (18)</b>	<b>49 (11)</b>	<b>31 (17)</b>	<b>35 (11)</b>	<b>45 (9)</b>	<b>38 (8)</b>	<b>49(21)</b>	<b>51 (11)</b>	<b>51 (11)</b>	<b>47 (19)</b>	<b>49 (22)</b>	<b>65 (11)</b>	<b>40 (15)</b>	<b>41 (30)</b>	<b>72 (8)</b>	

### 6.3 Conteúdo de substâncias poliméricas extracelulares (SPE)

#### 6.3.1 Composição de SPE: análise de espectros de fluorescência 3D-EEM

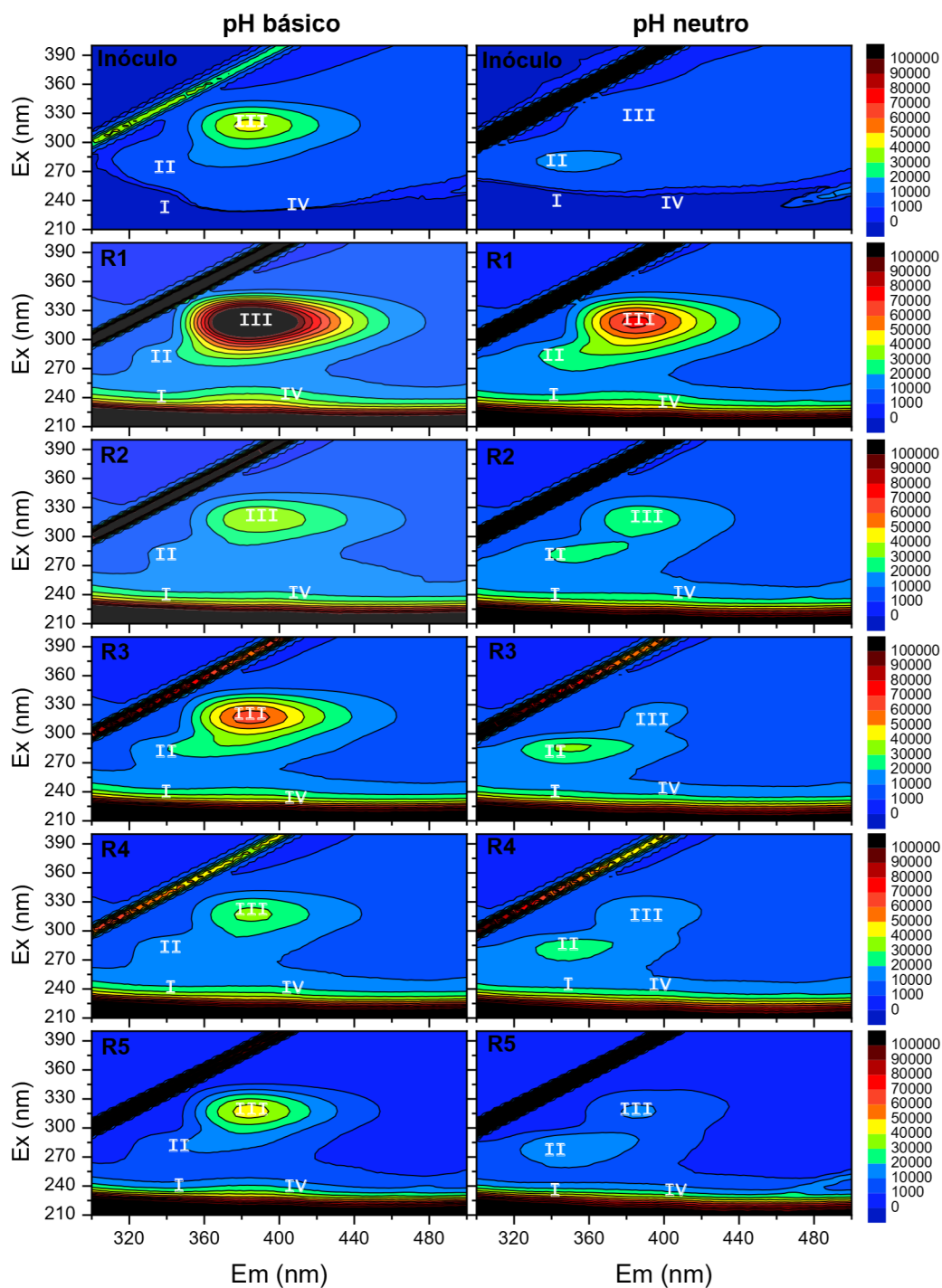
De acordo com estudos anteriores, os principais componentes das SPE são proteínas, polissacarídeos e ácidos húmicos (LI et al., 2020; SCHAMBECK et al., 2020). Nesse sentido, a composição das SPE de cada reator na última fase, incluindo o inóculo de lodo, foi analisada por espectroscopia de fluorescência EEM, sendo que os espectros representativos estão mostrados na Figura 4.

Embora os picos estejam visualmente indistinguíveis nos gráficos, as regiões I e IV foram encontradas somente em amostras de LGA e são compatíveis com a presença do aminoácido tirosina (Ex/Em = 250–300/300–320) e de substâncias semelhantes ao ácido fúlvico (Ex/Em = 200–250/380–440), respectivamente, em abundância (LUO et al., 2014). A dificuldade de visualização de determinadas substâncias pode ser justificada por diferenças na metodologia de extração das SPE, pois se sabe que a escolha do método de extração influencia não somente a quantidade total, mas também a composição dos polímeros recuperados (FELZ et al., 2016). Por exemplo, enquanto neste estudo foi aplicado a extração por calor modificado (com NaOH), o método de extração por formaldeído-NaOH foi aplicado no estudo de Luo et al. (2014).

A região II foi identificada entre os comprimentos de onda de excitação/emissão (Ex/Em) de 275–285/350–360 nm, referindo-se ao triptofano, e apresentou maior intensidade de fluorescência em amostras de pH neutro, uma vez que se trata de um aminoácido neutro. Enquanto a região III revelou um sinal de pico característico de polissacarídeos dentro do espectro Ex/Em de 300–360/330–390 nm, principalmente em amostras de pH básico. Estes resultados foram similares aos espectros de fluorescência encontrados por Liu e Cinquepalmi (2021).

Como pode ser observado na Figura 4, pela formação de picos e intensidade da fluorescência, o triptofano é um componente das SPE encontrado em maior concentração no lodo granular que no lodo ativado. Vale ressaltar que em R1, devido à alta concentração de polissacarídeos na amostra em pH neutro, o pico da região II se convergiu ao da região III.

**Figura 4** – Gráficos de matriz de emissão-excitação de fluorescência (FEEM) de SPE extraídas do inóculo e de grânulos aeróbios maduros em pH básico e pH neutro. Os eixos X e Y representam os espectros de emissão (Em) e de excitação (Ex) em nm, respectivamente, e as linhas de contorno representam a intensidade de fluorescência.



**Nota:** R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose).

### 6.3.2 Produção de SPE

Em relação à produção de SPE, o conteúdo de PS e PN aumentou durante o processo de granulação, uma vez que a biomassa granular aeróbia é relatada como tendo uma quantidade maior de SPE quando comparada aos flocos de lodo ativado utilizados como inóculo (NANCHARAI AH; KUMAR, 2018). Contudo, na fase III, houve uma diminuição do SPE, com exceção de R1, como pode ser observado na Tabela 6.

Todos os sistemas apresentaram uma relação PN/PS em torno de 2,0-3,0, indicando que a superfície do grânulo é mais hidrofóbica, o que favorece a agregação do lodo e a estabilidade da estrutura granular (CHEN et al., 2019). Semelhantemente, Wan et al. (2015), em estudos com acetato e propionato, constataram relação entre PN/PS em torno de 2. Entretanto, eles constataram melhor produção de SPE e melhores características de hidrofobicidade nos reatores alimentados com propionato. Por outro lado, He et al. (2018) observaram em reatores alimentados com uma mistura de acetato e glicose, altas relações de PN/PS, com valores entre 9 e 13.

**Tabela 6** – Conteúdo de polissacarídeos (PS) e de proteínas (PN), nas três fases operacionais (215 dias de operação) dos cinco reatores.

Período	Biomassa	PS (mg·gSSV <sup>-1</sup> )	PN (mg·gSSV <sup>-1</sup> )
Início	Inóculo	23,0	42,5
Fase I	R1	72 (15)	361 (250)
	R2	83 (11)	279 (98)
	R3	79 (12)	303 (253)
	R4	61 (7)	224 (155)
	R5	77 (12)	260 (181)
Fase II	R1	69 (8)	194 (26)
	R2	88 (19)	178 (50)
	R3	88 (43)	223 (114)
	R4	51 (15)	97 (39)
	R5	45 (21)	114 (49)
Fase III	R1	93 (44)	225 (76)
	R2	65 (21)	150 (58)
	R3	77 (19)	163 (39)
	R4	37 (16)	95 (35)
	R5	48 (18)	97 (29)



A produção de PS e PN foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) na fase I, comparado à fase III, em R2, R4 e R5. He et al. (2017) descobriram que o SPE poderia servir como fonte de carbono para processos biológicos em condições extremas. Desse modo, pode ter acontecido os seguintes fenômenos: (a) menor produção de SPE, devido ao aumento do diâmetro dos grânulos, causado pela limitação da difusividade do oxigênio e de carbono (VERAWATY et al., 2013); (b) maior taxa de respiração endógena devido ao aumento do TRC (ROLLEMBERG et al., 2020b); (c) e um período muito longo de fome (*famine*), induzindo os microrganismos a utilizarem as SPE como doadoras de elétrons (WU et al., 2012). Em contrapartida, R1 e R3 não apresentaram diferença significativa entre as fases, possivelmente devido à perda de biomassa e mudança na taxa de aeração, que levaram à instabilidade na estrutura dos grânulos, impulsionando a produção de mais SPE, já que, sob condições de estresse, os microrganismos tendem a secretar mais SPE para manter o seu formato (NANCHARAI AH; REDDY, 2018).

Em contraste a isso a maior produção de SPE em R1 ( $318 \text{ mg} \cdot \text{gSSV}^{-1}$ ) poderia também ser motivo da desintegração dos grânulos, dado relato em literatura (CORSINO et al., 2016) que a produção excessiva de SPE pode causar a fragmentação de grânulos por entupimento de seus poros. Acredita-se, todavia, que por tratar-se de um sistema biológico, em que diversas relações complexas são traçadas, tanto a produção de SPE devido a instabilidades por perda de biomassa e a fragmentação do grânulo por excesso de SPE, podem ter ocorrido concomitantemente.

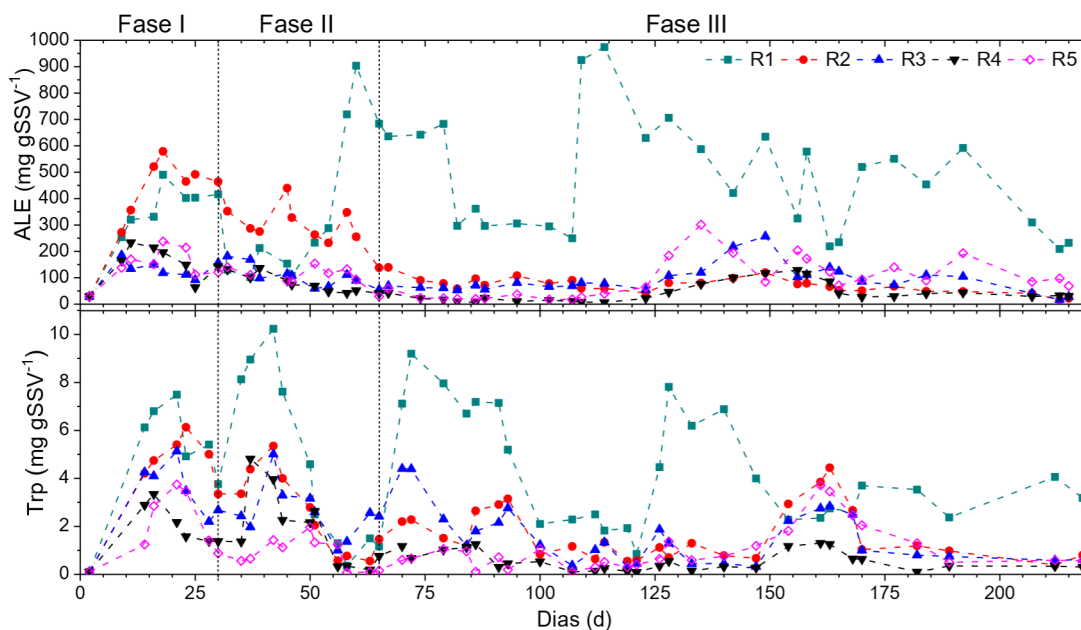
Estudos recentes têm demonstrado que a estrutura de ligação de proteína e carboidrato através da ligação de hidrogênio estar envolvida na formação de gel de SPE em LGA (LI et al., 2020; WANG et al., 2019). Essa estrutura aparece como a força de interação mais essencial para a estrutura secundária da proteína, bem como sugere uma interação mais forte entre os componentes. Por este motivo, em sistema LGA, instabilidades e desintegração de grânulos são encontradas quando há condições adversas prejudiciais para a sustentação da ligação de hidrogênio (LI et al., 2020). Nesse sentido, as instabilidades que surgiram em R1 possivelmente podem ter prejudicado essas ligações entre PS e PN, enfraquecendo a estrutura do grânulo, apesar da produção desses compostos se manter elevada.

### ***6.3.3 Produção de ALE e Trp***

As concentrações de ALE e Trp durante a formação dos grânulos aeróbios foram notoriamente maiores do que as encontradas em flocos de lodo ativado, corroborando aos

achados de Lin, Sharma e van Loosdrecht (2013). Na Figura 5 é apresentado graficamente os valores encontrados ao longo dos 215 dias de operação.

**Figura 5** – Produção de ALE e triptofano ao longo dos 215 dias de operação.



**Nota:** R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose).

Na maturação dos grânulos, o conteúdo de ALE aumentou apenas no R1, apesar de não apresentar uma diferença significativa na sua produção entre as fases ( $p > 0,05$ ). No entanto, nos demais reatores houve uma queda na produção de ALE, com diferença significativa entre as fases, bem como entre o tempo de cultivo e maturação ( $p < 0,05$ ), em contraste aos achados de Schambeck et al. (2020), onde o conteúdo de ALE continuou aumentando com a maturação do grânulo. Todavia, o dado desse estudo está em consonância com os dados encontrados para SPE, que também apresentou uma queda na produção com a maturação dos grânulos, concordando com a literatura ao mostrar que uma grande fração do SPE do LGA consiste de ALE (DE CARVALHO et al., 2021; SCHAMBECK et al., 2020; GUIMARÃES, 2017; FELZ et al., 2016).

No que diz respeito ao triptofano em R1 não houve diferença entre as fases ( $p > 0,05$ ), possivelmente devido ao baixo TRC durante todo o período operacional. A literatura tem indicado que idades de lodo menores (próximas a 6 dias) aumentam a formação de triptofano e substâncias semelhantes a proteínas (HAMZA et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2021). Nos demais reatores houve uma diminuição da produção na fase III, constatando-se

diferença significativa entre as fases, bem como entre o tempo de cultivo e de maturação ( $p < 0,05$ ). A maior produção de Trp está associada principalmente aos grânulos recém-formados, com diâmetros entre 0,5 e 1,0 mm (ROLLEMBERG et al., 2020b).

A redução da produção de ALE e Trp pode ser explicada também pelo aumento do TRC e longo período de fome, demonstrado na análise de ciclo que a maior parte da DQO era consumida no período anaeróbio. Esse comportamento está em aderência com os resultados de Rollemberg et al. (2020b), em que um TRC alto provocava uma diminuição no conteúdo de ALE em LGA. Além disso, os autores indicam a melhor produção de ALE com TRC entre 10 e 15 dias.

Estudos preliminares apontam PAOs como responsáveis pela produção de ALE. Como baixas remoções de fósforo foram obtidas, possivelmente a baixa produção de ALE na fase III está relacionada à baixa remoção de fósforo (GUIMARÃES, 2017). A redução do TRC poderia beneficiar o crescimento de PAOs, permitindo não só uma melhor remoção de fósforo como também uma maior produção de ALE. O descarte de lodo excedente em reatores LGA auxilia na remoção de fósforo, estabilidade de grânulos e redução de sólidos em suspensão no efluente tratado (BASSIN et al., 2012).

É importante ressaltar que em R1 foi observada uma tendência oposta na produção de ALE e triptofano, isto é, quando há uma queda na produção de ALE, há um aumento em Trp, por exemplo, entre os dias 40º e 55º, 70º e 100º, e novamente entre os dias 120º e 145º.

Comparando-se a produção dos recursos entre os reatores, observa-se que há diferenças significativas na produção de ALE e Trp nas três fases ( $p < 0,05$ ). O teste de Mann-Whitney acusou, para produção de ALE, que R1 e R2 eram estatisticamente maiores que R3, R4 e R5 nas fases I e II. Isso se deve possivelmente ao substrato aplicado, já que em grânulos, há indícios de que a produção de ALE esteja associada ao enriquecimento de PAOs no lodo (GUIMARÃES, 2017). Acetato e propionato são substratos preferíveis para o cultivo desse tipo de lodo, especialmente o segundo (OEHMEN et al., 2004; SHEN; ZHOU, 2016). Na fase III foi verificado que R1 possuía uma produção de ALE significativamente maior ( $p < 0,05$ ), provavelmente devido à instabilidade que o reator esteve submetido, com perda de biomassa e dando-lhe uma condição diferente (menor TRC) comparado aos demais reatores. Já R4 apresentou produção significativamente menor ( $p < 0,05$ ), o que é justificado pela menor produção de SPE, também estatisticamente menor quando comparada aos demais reatores ( $p < 0,05$ ).

Para o conteúdo de triptofano na fase I, R1 e R2 apresentaram as maiores

produções comparadas aos demais sistemas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, na fase II, as produções de Trp nos reatores foram todos estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ), com exceção de R5 que obteve valores menores, com diferença significativa em relação a R3 ( $p = 0,01$ ), indicando que acetato, propionato e glicerol são melhores substratos para produção desse recurso. O glicerol é apontado como favorável para produção de triptofano, pois pode gerar o PEP (fosfoenolpiruvato) como intermediário metabólico, o qual é consumido durante a produção de triptofano (NIU et al., 2019). Contudo, glicose e sacarose também são apontadas como substratos favoráveis para a produção deste recurso. Na fase III foi observada a mesma tendência da produção de ALE, justificando-se a maior produção de Trp em R1 pelo menor TRC (HAMZA et al., 2018; DE CARVALHO et al., 2021) e menor tamanho dos grânulos (ROLLEMBERG et al., 2020b).

Comparando-se os dados dessa pesquisa à literatura, verifica-se que a produção média de ALE em R1 ( $418 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) foi superior à encontrada por Rollemborg et al. (2020b),  $290 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ , também na presença de acetato. Por outro lado, R2 apresentou valores próximos ( $180 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) aos encontrados por Yang et al. (2014) ( $110 \text{ mgALE}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ), ambos na presença de propionato como substrato.

No que diz respeito ao triptofano, há poucos estudos avaliando sua produção em sistemas LGA. Rollemborg et al. (2020a), trabalhando com LGA alimentados por esgoto doméstico, encontraram produção de  $48 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ . Entretanto, quando acetato era usado como fonte de carbono com efluente sintético, valores em torno de  $54 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$  foram encontrados (ROLLEMBERG et al., 2020b), resultado superior ao que foi encontrado neste estudo, com teores de triptofano variando entre 0,6 e 4,1  $\text{mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ .

É importante notar que Pronk et al. (2017), em estudos realizados com grânulos de LGA alimentados por uma combinação de acetato (85%) e metanol (15%), chegaram à conclusão de que o ALE analisado na pesquisa não fazia parte das SPE envolvidas na estrutura do grânulo, porque a mesma permaneceu intacta após o procedimento de extração de ALE. Além disso, os autores obtiveram rendimento de ALE de apenas 1% da fração orgânica dos grânulos, enquanto que nessa pesquisa os rendimentos médios foram de 43% (R1), 7% (R2), 9% (R3), 4% (R4) e 9% (R5). Contudo o TRC empregado nas pesquisas de Pronk et al. (2015, 2017) foi de 51 a 24 dias, semelhantes ao dessa pesquisa nos reatores R2, R3, R4 e R5. Possivelmente isso significa que o consumo endógeno da biomassa com o aumento do TRC é predominantemente de ALE. Além disso, nos reatores R2, R3, R4 e R5, não foi observada desintegração dos grânulos após a extração de ALE, corroborando os estudos de Pronk et al. (2017). Vale salientar que a metodologia de extração de ALE dessas pesquisas foram as

mesmas.

**Tabela 6** – Conteúdo médio de ALE e triptofano nos reatores em cada fase.

Período	Reator	ALE (mg·gSSV <sup>-1</sup> )	Trp (mg·gSSV <sup>-1</sup> )
Fase I	R1	373,8 (72,0)	6,1 (1,5)
	R2	449,8 (95,9)	4,7 (0,9)
	R3	135,4 (29,0)	3,6 (1,1)
	R4	183,6 (33,7)	2,1 (0,7)
	R5	163,4 (43,7)	2,3 (1,1)
Fase II	R1	165,4 (72,7)	4,6 (2,5)
	R2	282,0 (89,7)	2,5 (1,6)
	R3	105,4 (40,6)	2,6 (1,0)
	R4	78,4 (33,5)	1,9 (1,5)
	R5	109,7 (20,0)	1,1 (0,7)
Fase III	R1	418,7 (162,2)	4,3 (2,3)
	R2	71,1 (21,4)	1,6 (1,0)
	R3	89,0 (50,4)	1,6 (1,1)
	R4	38,5 (31,6)	0,6 (0,4)
	R5	81,1 (54,5)	0,9 (0,6)

**Nota:** R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose).

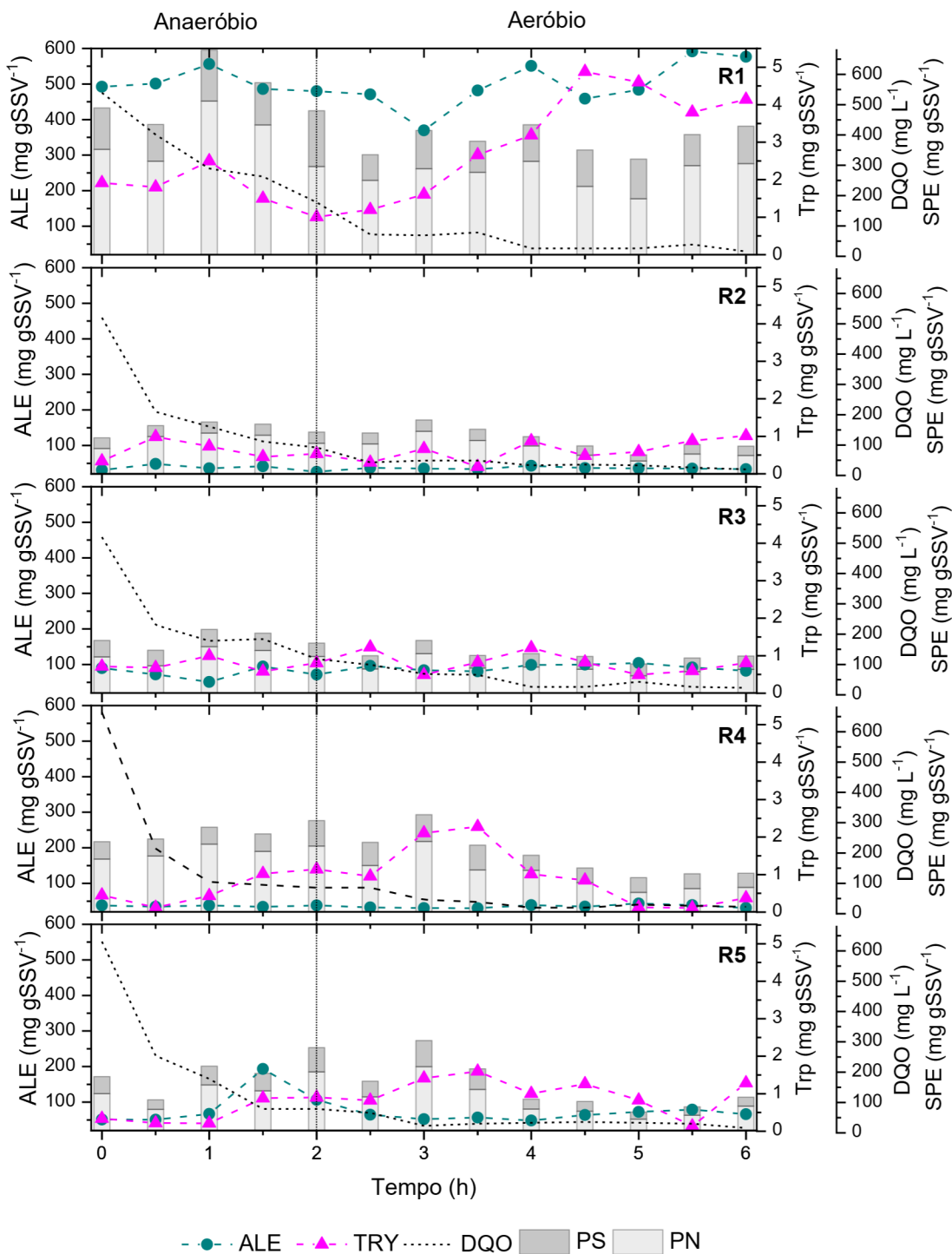
#### 6.4 Produção e consumo de ALE e Trp ao longo do ciclo

A produção dos compostos (ALE e Trp) nos reatores variou ao longo do ciclo (Figura 6). Enquanto que em R1 os grânulos mostraram maior produção do conteúdo de ALE e Trp ao final do ciclo, após 3 horas de aeração, os demais reatores não apresentaram uma tendência muito clara, especialmente para ALE, possivelmente devido a uma taxa de respiração endógena maior que levaria ao consumo de SPE.

Ao final do período anaeróbio, havia em torno de 35% da DQO afluente em R1, enquanto que em R2 e R3 foi em torno de 20% e em R4 e R5, apenas 13%, evidenciando, dessa forma, que o decaimento rápido da matéria orgânica, especialmente nos reatores de maior TRC, poderia ter levado aos sistemas a um período de fome prologado, o que levou ao maior consumo de exopolímeros como matéria orgânica. Esse consumo é evidente nos dados de SPE ao longo do ciclo, na qual, em R2, R3, R4 e R5 pode ser observado uma queda no

valor após 3,5 h, fortalecendo a hipótese de que a parte das SPE consumidas nessas condições está relacionada predominantemente aos recursos.

**Figura 6** – Variação dos compostos (ALE e Trp), DQO e SPE ao longo do ciclo operacional (6 horas).



**Nota:** R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose).

É importante observar que os maiores teores de ALE e Trp podem variar devido a vários fatores, como características do afluente, concentração de biomassa e oxigênio dissolvido, entre outros. Assim, um plano de monitoramento deve ser conduzido para

combinar uma boa estabilidade operacional do LGA, sua eficiência para remover simultaneamente C, N e P, e também atingir a maior produtividade dos recursos desejados a serem recuperados (ROLLEMBERG et al., 2020b).

### **6.5 Caracterização microbiológica: Possíveis grupos microbianos envolvidos na produção de ALE e Trp**

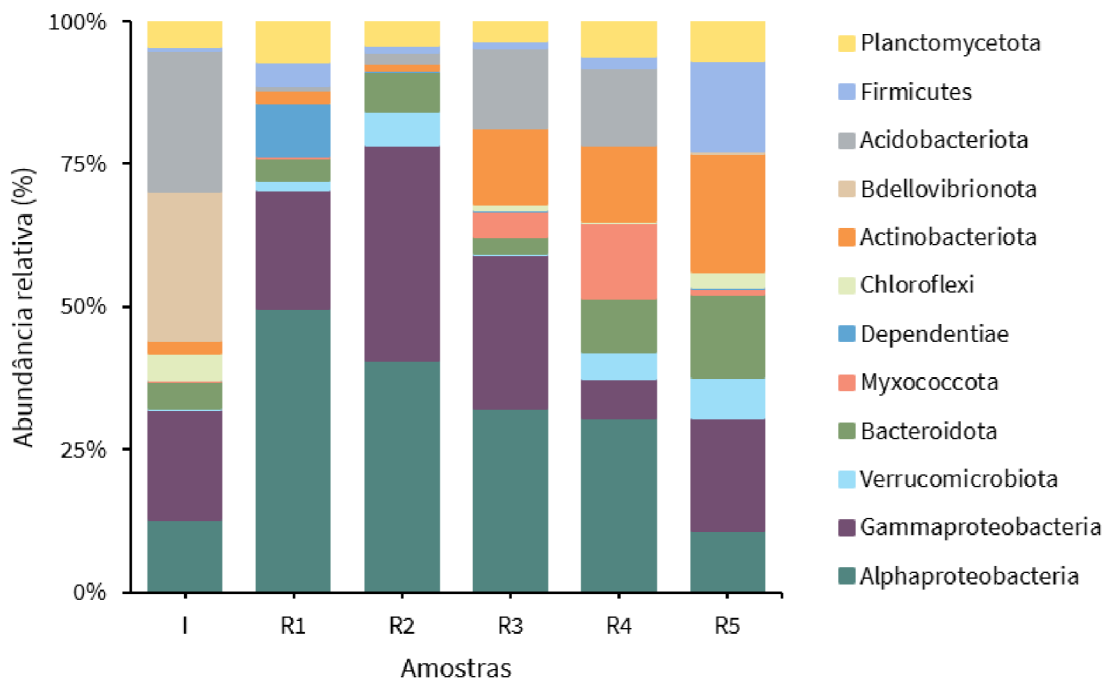
As análises microbiológicas foram realizadas em amostras dos lodos de inóculo (I) e de todos os reatores no final da operação. Avaliou-se a diversidade microbiana por filo, família e gênero.

A Figura 7 apresenta a distribuição relativa da diversidade de microrganismos por filo nas amostras. O lodo ativado de inóculo apresentou abundância microbiana de: Bdellovibrionota (25,9%); Acidobacteriota (24,5%); Gammaproteobacteria (19,0%); Alphaproteobacteria (12,7%), Bacteroidota, Chloroflexi e Planctomycetota (entre 4,3-4,8% cada). Com o processo de granulação, a dominância dos filos Bdellovibrionota e Acidobacteriota presentes no lodo de inóculo foi drasticamente reduzida em todos os reatores de lodo granular aeróbio.

Cada reator apresentou uma diversidade microbiana diferente, de modo que a fonte de carbono parece ter influenciado na dinâmica populacional na formação do lodo granular aeróbio, assim impactando nas características físico-químicas dos grânulos, por exemplo. Apesar disso, em todos os reatores se observou a dominância do filo Proteobacteria, incluindo as classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, com as seguintes abundâncias: 70,2% em R1, 77,8% em R2, 58,4% em R3, 37,0% em R4 e 30,2% em R5. Proteobactérias são comumente predominantes no lodo granular aeróbio com função de secretar SPE para formação de grânulos aeróbios (LIU et al., 2017). Como se sabe, esses exopolímeros são majoritariamente de polissacarídeos e proteínas, portanto a fração de Proteobacteria parece ter sido importante para a produção de ALE e de triptofano nos sistemas experimentais (MENG et al., 2019).

**Figura 7** – Distribuição relativa da diversidade microbiana do lodo ativado de inóculo (I) e do lodo granular aeróbio cultivado em R1 (acetato), R2 (propionato), R3 (glicerol), R4 (glicose) e R5 (sacarose). O gráfico de barras representa apenas os filos com mais de 1% abundância bacteriana total nas amostras.





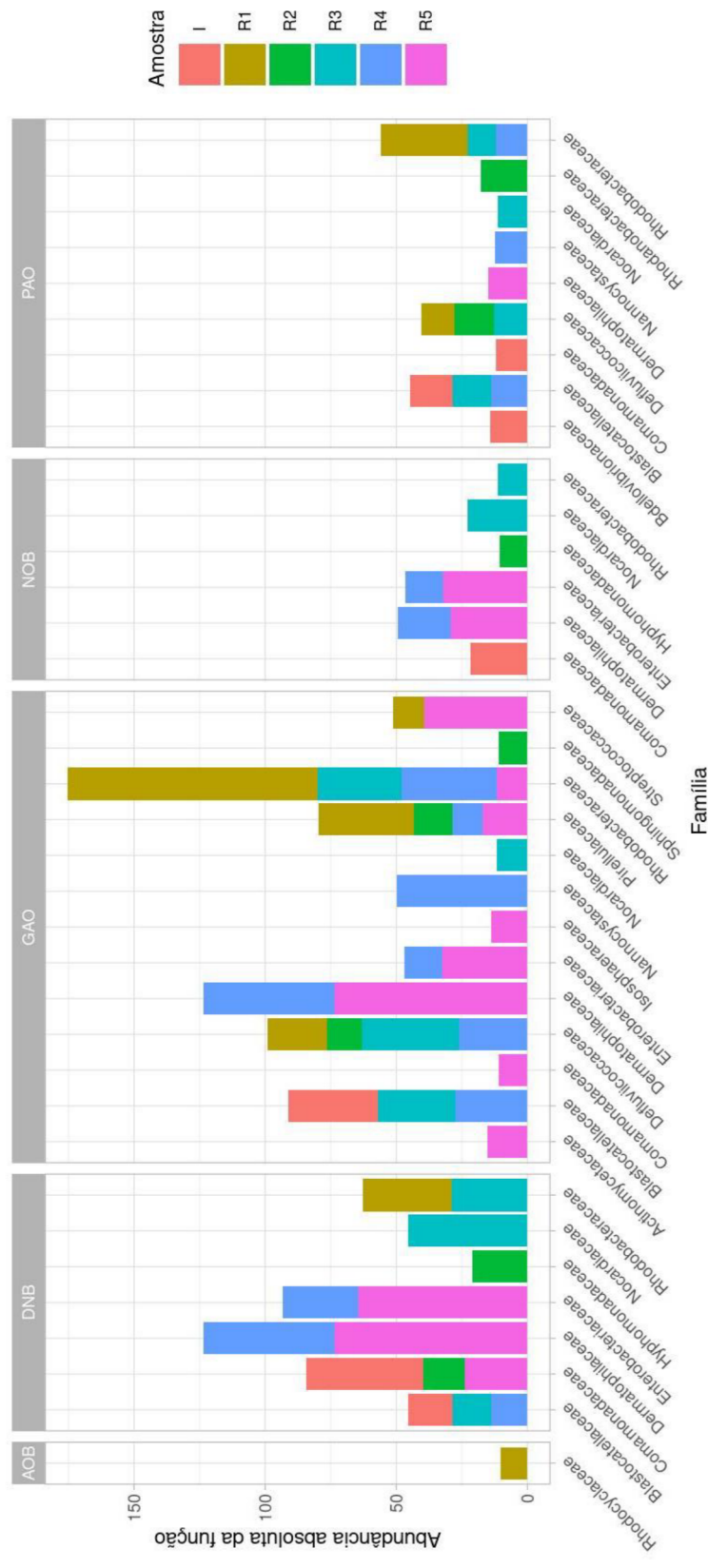
A Figura 8 apresenta grupos microbianos envolvidos especificamente na remoção de carbono, nitrogênio e fósforo a nível de família. Famílias de proteobactérias, tais como Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae e Rhodocyclaceae, parecem facilitar a liberação de SPE e o desenvolvimento de grânulos, incentivando a produção de moléculas de sinalização, como c-di-GMP (WAN et al. 2013; HAN et al., 2022). A ocorrência dessas famílias nos retores totalizou as seguintes abundâncias relativas, com destaque para família Rhodobacteraceae, que foi identificada principalmente como PAOs e GAOs: 40,8% em R1, 8,2% em R2, 10,5% em R3, 12,2% em R4 e 5,6% em R5. Esses grupos microbianos, especialmente PAOs, estão possivelmente associados com a estabilidade do grânulo e também com a produção de ALE (SCHAMBECK et al., 2020; GUIMARÃES, 2017).

Em relação às bactérias nitrificantes, ocorreu maior abundância de AOB, principalmente em R1. Por outro lado, a abundância de NOB foi observada em R2, R3, R4 e R5, indicando melhores conversões de nitrito para nitrato. Isso pode estar relacionado com o tempo de retenção celular (TRC), uma vez que os valores encontrados para os reatores foram completamente diferentes, ou seja, 4 dias em R1 e acima de 30 dias em R2, R3, R4 e R5. De acordo com a literatura, baixo TRC à alta temperatura pode inibir NOB, levando ao acúmulo de nitrito (LEMAIRE; MARCELINO; YUAN, 2008).

As bactérias desnitrificantes apareceram em abundância em todos os reatores, principalmente em R4 e R5. A menor abundância de desnitrificantes em R2 e R3 pode

justificar a alta concentração de nitrato no efluente ( $> 10 \text{ mgNO}_3^- \cdot \text{N} \cdot \text{L}^{-1}$ ), o que não foi observado em R1. Apesar dessas diferenças entre as populações microbianas de nitrificantes e desnitrificantes, a eficiência de remoção de nitrogênio foi similar entre os sistemas estudados (entre 72-78%). A abundância de PAOs se mostrou similar em todos os reatores. Além disso, ocorreu uma predominância de GAOs sobre PAOs na competição pelo substrato, justificando uma baixa remoção de fósforo (entre 45-65%) em comparação com outros trabalhos (BASSIN et al., 2012).

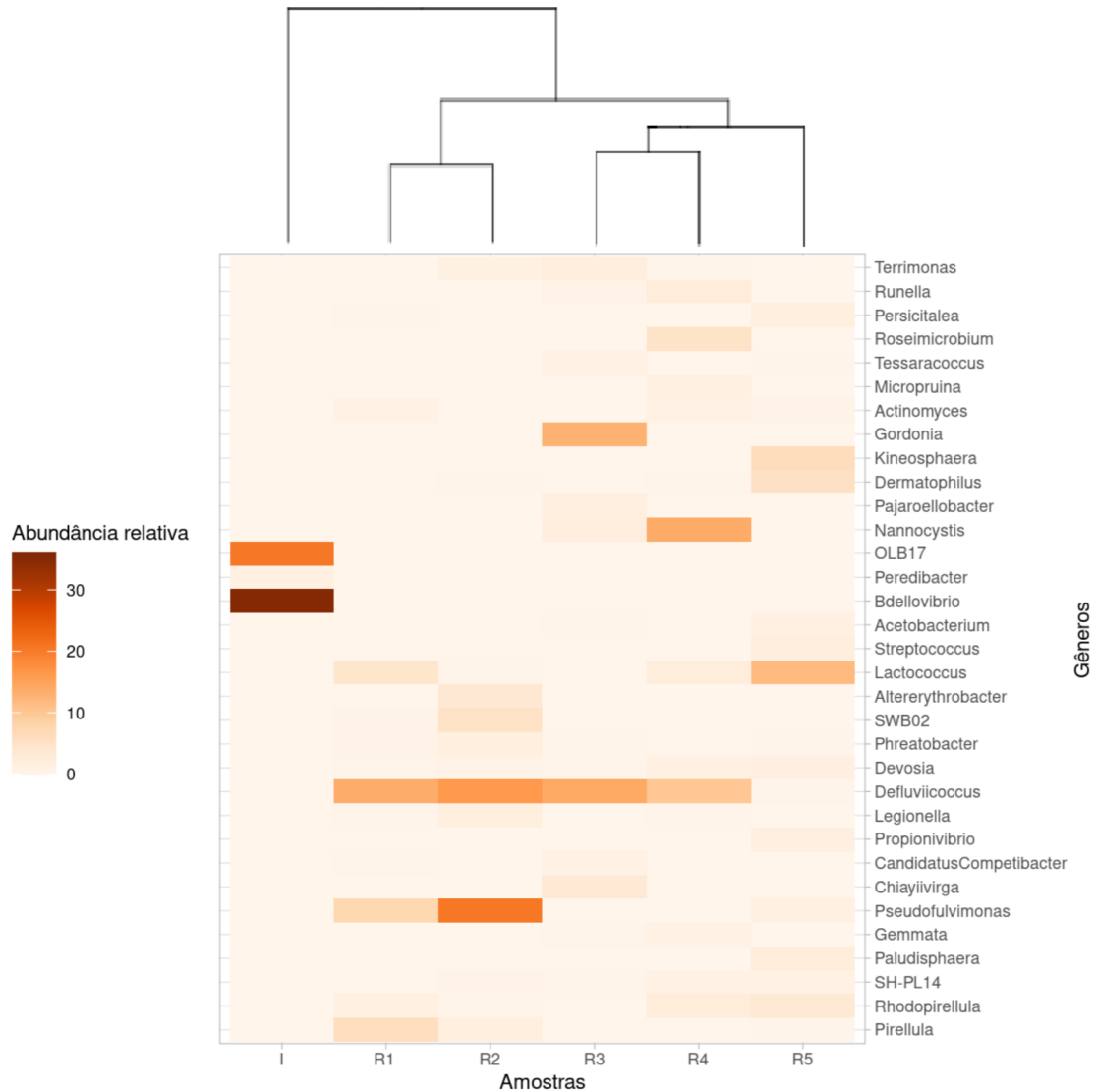
**Figura 8** – Grupos funcionais identificados por família no inóculo e nos sistemas experimentais (abundância absoluta das funções  $\geq 10$ ).



**Legenda:** bactérias oxidadoras de amônia (AOB), bactérias oxidadoras de nitrito (NOB), organismos acumuladores de glicogênio (GAO), organismos acumuladores de polifosfato (PAOs) e bactérias desnitrificantes (DNB).

A Figura 9 representa a diversidade microbiana a nível de gênero do inóculo e dos sistemas experimentais.

**Figura 9** – Diversidade microbiana relativa a nível de gênero do inóculo (I) e dos reatores. O mapa de calor apresenta os gêneros com mais de 1% de abundância bacteriana total em pelo menos uma das amostras.



Em todas as amostras analisadas, observou-se a abundância de organismos heterotróficos. No inóculo, os gêneros de bactérias dominantes foram *Bdellovibrio* (23,9%) e *OLB17* (13,9%), pertencentes respectivamente aos filos dominantes. Espécies de *Bdellovibrio* (filo Bdellovibrionota) são predadoras de alimentação indiscriminada, que podem alterar significativamente a composição de espécies e, portanto, prejudicar o desempenho

operacional dos sistemas de tratamento de águas residuárias (FENG et al., 2017). Enquanto *OLB17* (filo Acidobacteriota) na forma filamentosa, quando encontrada em abundância, pode prejudicar a estrutura granular (CHEN et al., 2021; QIULAU et al., 2019). Desse modo, considera-se que as condições operacionais aplicadas no cultivo do lodo granular aeróbio, como o ciclo operacional com alternância entre períodos anaeróbios e aeróbios, são desfavoráveis para a proliferação desses microrganismos.

Os principais gêneros identificados em cada reator foram: *Defluviicoccus* (12,2% em R1, 14,4% em R2, 11,9% em R3 e 9,5% em R4), *Pseudofulvimonas* (6,8% em R1 e 17,0% em R2), *Gordonia* (10,5%) em R3, *Nannocystis* (11,9%) em R4, além de *Lactococcus* (9,9%) e *Kineosphaera* (5,4%) ambas em R5. Todos esses microrganismos identificados como abundantes nos reatores são capazes de produzir e secretar SPE (PRONK et al., 2017; YAN et al., 2022; SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2018; LI et al., 2019; LI et al., 2020; XU et al., 2021).

*Defluviicoccus* foi o principal gênero de organismos desnitrificantes acumuladores de glicogênio (DGAOs) encontrado em R1, R2, R3 e R4 (LI et al., 2020). A dominância de *Defluviicoccus* e *Pseudofulvimonas* (ambas pertencentes ao filo Proteobacteria) em R1 e R2 indica a preferência destes microrganismos por substratos facilmente biodegradáveis, como acetato e propionato. *Gordonia* (filo Actinobacteriota) são bactérias envolvidas na remoção de amônia via nitrificação heterotrófica/desnitrificação aeróbia, consumindo substratos complexos, inclusive glicerol (SILVA et al., 2019; CARR; EALES; SEVIOUR, 2006). Já *Nannocystis* (filo Myxococcota) são bactérias desnitrificantes (BDN) capazes de secretar substâncias floculantes, cuja atividade de floculação depende da coexistência de cátions (QIU et al., 2022). Entretanto, o excesso de biofloculante no meio, em vez de contribuir para a estabilidade da estrutura granular, pode alterar a carga superficial de agregados microbianos e dificultar a adesão e coesão entre eles, prejudicando o processo de granulação, o que possivelmente ocorreu em R4 (LIANG et al., 2019). Além disso, nesse reator, foram encontrados gêneros de bactérias filamentosas, como *Actinomyces* e *Runella*. *Lactococcus* (filo Firmicutes) conhecidas como anaeróbias facultativas, ou seja, seu metabolismo pode alternar entre respiração aeróbia, fermentação ou respiração anaeróbia de acordo com o ambiente, o que significa que são altamente competitivas na utilização de substrato (ZHANG et al., 2019). Nesse caso, a abundância de bactérias fermentativas sugere a necessidade de degradar o substrato complexo (sacarose) em ácidos graxos de cadeia curta para serem posteriormente utilizados como fonte de carbono por outros microrganismos (DOCKX et al., 2021).

Em relação à produção de ALE, Yang et al. (2014), ao verificarem a granulação aeróbia sob variações bruscas da carga orgânica volumétrica (COV), entre 4,4 e 17,4 kgDQO·m<sup>-3</sup>·d<sup>-1</sup>, observaram os microrganismos foram estimulados a secretar o segundo mensageiro di-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) e, conseqüentemente, a produzir ALE em excesso, que formaram uma grande quantidade de material viscoso, servindo como precursor de grânulos aeróbios. Isto é, altos níveis de c-di-GMP intracelular, que sinalizam a expressão gênica de Psl e Alg, por exemplo, promovem a produção de exopolissacarídeos, inclusive de ALE, para fixação da matriz e adesão da biomassa (WAN et al., 2015; WANG et al., 2017). Partindo disso, possíveis bactérias, cuja produção de SPE pode ser regulada por c-di-GMP, foram identificadas em cada reator em abundância: *Pirellula* (5,3% em R1 e 3,0% em R2), *Pseudofulvimonas* (6,8% em R1 e 17,0% em R2), *Gordonia* (2,3% em R3) e *Lactococcus* (3,7% em R1, 1,8% em R4 e 9,9% em R5) (CHOU, GALPERIN, 2016; CHEN et al., 2022; HOU et al., 2019). Vale ressaltar também que, reconhecidamente, o alginato bacteriano é produzido por pelas proteobactérias *Pseudomonas spp.* e *Azotobacter vinelandii* (HAY et al., 2014). No entanto, o método de sequenciamento de amplicon ASV (do inglês, *Amplicon Sequencing Variants*) revelou a presença de *Pseudomonas* apenas em R1 (0,01%) e em R2 (0,06%), indicando que outras bactérias estão envolvidas na produção de ALE.

Até o momento, poucas bactérias associadas à produção de triptofano em LGA foram identificadas. Relata-se que, em baixas razões de C:N (em torno de 5) do afluente, há acúmulo de triptofano no sistema devido ao favorecimento de bactérias dos gêneros *Thauera* e *Paracoccus*, portanto relacionando-se positivamente à produção desse aminoácido (YU et al., 2020; ZHANG et al., 2018a). Esses organismos, em especial o gênero *Thauera*, estão relacionados à melhora da capacidade de desnitrificação dos sistemas, devido a estarem em maior abundância no núcleo dos grânulos, juntamente com *Nitrosomonas*, por exemplo (LUO et al., 2014). Por outro lado, eles também são associados à redução na capacidade de nitrificação dos sistemas (ZHANG et al., 2018a). Assim, é possível que estratégias operacionais que promovam a produção de triptofano afetem a remoção de nitrogênio dos sistemas LGA (DE CARVALHO et al., 2021). Neste estudo, apenas as bactérias *Thauera* foram identificadas em R1 (0,3%), R2 (0,3%) e R4 (0,1%), indicando que esse gênero provavelmente não foi o único responsável pela produção de Trp. Entretanto, partindo das conclusões acima, algumas análises podem ser realizadas para além da presença dessas bactérias.

Wang et al. (2018) verificaram a existência de triptofano em lodo granular aeróbio dominado por bactérias aeróbias oxidadoras de amônia (AerAOB). Desse modo, esse grupo

funcional pode estar possivelmente associado à produção desse aminoácido. Ao encontro desse estudo, R1 apresentou uma abundância de AOB e, inclusive, um maior conteúdo de triptofano ( $4,1 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ). Além disso, a produção de triptofano aparentemente foi favorável em reatores com ambiente anóxico (presença de nitrato no microambiente), como em R2 e R3 ( $1,6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ). Similarmente, Rolleberg et al. (2020a) constataram que um curto período anóxico no ciclo operacional pode estimular a produção de triptofano. De modo geral, provavelmente a abundância de microrganismos filamentosos em R4 foi prejudicial para formação de uma matriz extracelular rica de recursos de alto valor agregado ( $0,6 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ). Como visto, a sacarose como fonte de carbono (R5) viabilizou o desenvolvimento de bactérias fermentadoras, como *Acetobacterium*, *Lactococcus*, *Propionivibrio* e *Streptococcus*, no meio, que podem ter aumentado a quantidade de triptofano nos grânulos ( $0,9 \text{ mgTrp}\cdot\text{gSSV}^{-1}$ ) em comparação com R4 (ROAGER; LICHT, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

O reator de LGA alimentado com acetato (R1) apresentou maior produção de ALE e triptofano comparado ao demais sistemas, possivelmente devido a sua maior produção de SPE, menor TRC e menor tamanho dos grânulos, resultado de instabilidades e perda de biomassa na maturação do grânulo.

Propionato (R2) apresentou resultados animadores na produção de ALE durante as duas primeiras fases, significativamente maior que os reatores operados com glicerol (R3), glicose (R4) e sacarose (R5). Já na produção de triptofano, além do acetato (R1) e propionato (R2), glicerol (R3) mostrou-se um bom substrato.

O aumento do TRC revelou-se prejudicial à produção de recursos, indicando uma maior taxa de respiração endógena pelo consumo de SPE. Além disso, um longo período de fome (*famine*), evidenciado pela análise de ciclo, indicou um maior consumo de SPE com menor produção de ALE e triptofano.

Recomenda-se, nesse sentido, a investigações da produção de recursos sobre TRC controlado em valores menores (10 a 15 dias), bem como diminuição do período de fome na etapa aeróbia.



## REFERÊNCIAS

- ADAV, S. S. et al. Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. **Environmental Technology**, v. 85, p. 753–762, 2010.
- ADAV, S. S.; LEE, D. J.; TAY, J. H. Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. **Water Research**, v. 42, p. 1644–1650, 2008.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22. ed. Washington, D.C., 2012.
- BARROS, A. R. M. et al. Effect of calcium addition on the formation and maintenance of aerobic granular sludge (LGA) in simultaneous fill/draw mode sequencing batch reactors (RBSs). **Journal of Environmental Management**, v. 255, n. September 2019, 2020.
- BASSIN, J. P. et al. Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 1919–1928, 2012.
- BENGTSSON, S. et al. Treatment of municipal wastewater with aerobic granular sludge. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–48, 2018.
- BEUN, J. J. et al. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 33, p. 2283–2290, 1999.
- BEUN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; HEIJNEN, J. J. Aerobic granulation. **Water Science Technology**, v. 41, p. 41–48, 2000.
- BOLEIJ, M. et al. Solubilization and characterization of extracellular proteins from anammox granular sludge. **Water Research**, v. 164, n. 114952, 2019.
- BORGOS, S. E. F. et al. Mapping global effects of the anti-sigma factor MucA in *Pseudomonas fluorescens* SBW25 through genome-scale metabolic modeling. **BMC Systems Biology**, v. 7, p. 1–15, 2013.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.
- CAMPO, R. et al. The role of extracellular polymeric substances on aerobic granulation with stepwise increase of salinity. **Separation and Purification Technology**, v. 195, p. 12–20, 2018.
- CAO, L. et al. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: a review. **Carbohydrates Polymers**, v. 242, n. 116389, 2020.
- CARR, E. L.; EALES, K. L.; SEVIOUR, R. J. Substrate uptake by *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. **Water Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 39–45, 2006.
- CARVALHEIRA, M. et al. The impact of aeration on the competition between polyphosphate

accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. **Water Research**, v. 66, p. 296-307, 2014.

CHEN, F. Y. et al. Operational strategies for nitrogen removal in granular sequencing batch reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, n. 1–2, p. 342–348, 2011.

CHEN, G. et al. Rapid reformation of larger aerobic granular sludge in an internal circulation membrane bioreactor after long-term operation: Effect of short time aeration. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 462–467, 2019.

CHEN, H. et al. Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) mediated membrane fouling in membrane bioreactor. **Journal of Membrane Science**, v. 646, n. 120224, 2022.

CHEN, W. et al. Deciphering the mechanism of medium size anammox granular sludge driving better nitrogen removal performance. **Bioresource Technology**, v. 336, n. 125317, 2021.

CHOU, S. H.; GALPERIN, M. Y. Diversity of the c-di-GMP binding proteins and mechanisms. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 1, p. 32–46, 2016.

CORSINO, S. F. et al. Fate of aerobic granular sludge in the long-term: The role of SPEs on the clogging of granular sludge porosity. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 541–550, 2016.

CORSINO, S. F. et al. Physical properties and extracellular polymeric substances pattern of aerobic granular sludge treating hypersaline wastewater. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 152–159, 2017.

DE BRUIN, L. M. M. et al. Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? **Water Science and Technology**, v. 49, n. 230, n. 11–12, p. 1–7, 2004.

DE CARVALHO, C. A. et al. Resource recovery in aerobic granular sludge systems: is it feasible or still a long way to go? **Chemosphere**, v. 274, n. 129881, 2021.

DE GRAAFF, D. R. et al. Sialic acids in the extracellular polymeric substances of seawater-adapted aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 155, p. 343–351, 2019.

DE KREUK, M. K. et al. Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. **Water Research**, v. 44, p. 5929–5938, 2010.

DE KREUK, M. K.; HEIJNEN, J. J.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 761–769, 2005.

DE KREUK, M. K.; KISHIDA, N.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Aerobic granular sludge – state of the art. **Water Science and Technology**, v. 55, n. 8–9, p. 75, 2007.

- DE KREUK, M. K.; PRONK, M.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. **Water Research**, v. 39, p. 4476–4484, 2005.
- DE KREUK, M. K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. **Water Science and Technology**, v. 49, p. 9–17, 2004.
- DI BELLA, G.; TORREGROSSA, M. Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 706-713, 2013.
- DI IACONI, C. et al. SBBGR technology for minimizing excess sludge production in biological processes. **Water Research**, v. 44, v. 6, p.1825–1832, 2010.
- DOCKX, L. et al. Impact of the substrate composition on enhanced biological phosphorus removal during formation of aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 337, n. 125482, 2021.
- DOS SANTOS, A. B. et al. Enhancing the electron transfer capacity and subsequent colour removal in bioreactors by applying thermophilic anaerobic treatment and redox mediators. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 42-52, 2005.
- DOUGLAS, G. M. et al. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. **Nature Biotechnology**, v. 38, p. 685–688, 2020.
- DU, S. et al. Characteristics of aerobic granular sludge cultivated by promoting and inhibiting filamentous bacteria. *Advanced Materials Research*, v. 183–185, p. 1075–1079, 2011.
- DUBÉ, C. D., GUIOT, S. R. Characterization of the protein fraction of the extracellular polymeric substances of three anaerobic granular sludges. **AMB Express**, v. 9, n. 23, 2019.
- DUTCH WATER SECTOR. Second plant to produce Kaumera Nereda Gum from sewage sludge, 2020. Disponível em: <<https://www.dutchwatersector.com/news/second-plant-to-produce-kaumera-nereda-gum-from-sewage-sludge>>. Acesso em: 11 jan. 2021.
- FAVERO NETO, J.; GIAQUINTO, P. C. Environmental enrichment techniques and tryptophan supplementation used to improve the quality of life and animal welfare of Nile tilapia. **Aquaculture Reports**, v. 17, n. April, p. 100354, 2020.
- FELZ, S. et al. Aerobic granular sludge contains hyaluronic acid-like and sulfated glycosaminoglycans-like polymers. **Water Research**, v. 169, n. 115291, 2020.
- FELZ, S. et al. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (SPE). **Water Research**, v. 157, p. 201–208, 2019.
- FELZ, S. et al. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 115, p. 1–8, 2016.

FENG, C. et al. Extracellular polymeric substances extraction and recovery from anammox granules: evaluation of methods and protocol development. **Chemical Engineering Journal**, v. 374, p. 112–122, 2019.

FENG, S. et al. Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* significantly reduces viability and alters the microbial community composition of activated sludge flocs and granules. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 4, 2017.

FERNÁNDEZ, I. et al. Influence of the shear stress and salinity on Anammox biofilms formation: modelling results. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 1955–1961, 2014.

FLEMMING, H. C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 623, 2010.

FOLADORI, P.; ANDREOTTOLA, G.; ZIGLIO, G. **Sludge Reduction Technologies in Wastewater Treatment Plants**. Londres: IWA Publishing, 2010.

GAGLIANO, M.C. et al. EPS glycoconjugate profiles shift as adaptive response in anaerobic microbial granulation at high salinity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1423, 2018.

GAO, D. et al. Comparison of four enhancement strategies for aerobic granulation in sequencing batch reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 320–327, 2011.

GAO, F. et al. Hydroxyl radical pretreatment for low-viscosity sodium alginate production from brown seaweed. **Algal Research**, v. 34, p. 191–197, 2018.

GIMMESTAD, M. et al. **New mutant strains of Pseudomonas fluorescens and variants thereof, methods for their production, and uses thereof in alginate production**. WO 2004/011628-A1. Concessão: 05 fev. 2004.

GUEST, J. S. et al. A new planning and design paradigm to achieve sustainable resource recovery from wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 16, p. 6126–6130, 2009.

GUIMARÃES, L. B. **Caracterização microbiológica do lodo granular na remoção de nutrientes e potencial de recuperação de exopolímeros de efluentes reatores em bateladas sequenciais**. 2017. 261 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

GUO, H. et al. Structural extracellular polymeric substances determine the difference in digestibility between waste activated sludge and aerobic granules. **Water Research**, v. 181, p. 115924, 2020.

HAMZA, R. A. et al. 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, 2018.

HAN, F. et al. Enhancing robustness of halophilic aerobic granule sludge by granular activated carbon at decreasing temperature. **Chemosphere**, v. 292, n. 133507, 2022.

HARRIS, P. W.; MCCABE, B. K. Review of pre-treatments used in anaerobic digestion and their potential application in high-fat cattle slaughterhouse wastewater. **Applied Energy**, v. 155, p. 560–575, 2015.

HAY, Y. D. et al. Genetics and regulation of bacterial alginate production. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 2997–3011, 2014.

HE, Q. et al. Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity. **Chemical Engineering Journal**, v. 326, p. 1223–1231, 2017.

HE, Q. et al. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. **Chemical Engineering Journal**, v. 331, p. 841–849, 2018.

HOU, M. et al. Performance and bacterial characteristics of aerobic granular sludge in response to alternating salinity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 142, p. 211–217, 2019.

HUBER, W. et al. Orchestrating high through put genomic analysis with Bioconductor. **Nature Methods**, v. 12, p. 115–121, 2015.

HUVAERE, K.; SKIBSTED, L. H. Light-induced oxidation of tryptophan and histidine. Reactivity of aromatic N-heterocycles toward triplet-excited flavins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 23, p. 8049–8060, 2009.

ILLUMINA, 2013. **16S Metagenomic Sequencing Library Preparation**. Illumina Guides. Disponível em: <[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)>. Acesso em: 08 mar. 2022.

JUANG, Y. C. et al. Stable aerobic granules for continuous flow reactors: Precipitating calcium and iron salts in granular interiors. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8051–8057, 2010.

KANG, A. J.; YUAN, Q. Long-term stability and nutrient removal efficiency of aerobic granules at low organic loads. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 336–342, 2017.

KARAKAS, I. et al. Resource recovery from an aerobic granular sludge process treating domestic wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 34, n. January, p. 101148, 2020.

KAUMERA. **Kaumera**, 2020. Disponível em: <<http://kaumera.com/english/kaumera>>. Acesso em: 11 abr. 2020.

KEGGREST: Client-side REST access to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). R package version 1.32.0: Tenenbaum, D; Maintainer, B., 2021.

KEHREIN, P. et al. Exploring resource recovery potentials for the aerobic granular sludge process by mass and energy balances-energy, biopolymer and phosphorous recovery from municipal wastewater. **Environmental Science: Water Research and Technology**, v. 6, n. 8, p. 2164–2179, 2020.

KONOSUKE, M. S.; MITSUGI, Y. K. Method of preparing l-tryptophan. US3929573A. Concessão: 30 dez. 1975.

LADNORG, S. et al. Alginate-like exopolysaccharide extracted from aerobic granular sludge as biosorbent for methylene blue: Thermodynamic, kinetic and isotherm studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 103081, 2019.

LASHKARIZADEH, M. et al. Influence of carbon source on nutrient removal performance and physical-chemical characteristics of aerobic granular sludge. **Environmental Technology**, v. 36, n. 17, p. 2161–2167, 2015.

LEMAIRE, R.; MARCELINO, M.; YUAN, Z. Achieving the nitrite pathway using aeration phase length control and step-feed in an SBR removing nutrients from abattoir wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 6, 1228–1236, 2008.

LI, D. et al. Aerobic granular sludge operation and nutrients removal mechanism in a novel configuration reactor combined sequencing batch reactor and continuous-flow reactor. **Bioresource Technology**, v. 292, N. 122024, 2019.

LI, D. C. et al. Enhanced granulation process, a more effective way of aerobic granular sludge cultivation in pilot-scale application comparing to normal granulation process: From the perspective of microbial insights. **Science of the Total Environment**, v. 707, n. 136106, 2020.

LI, Z. et al. Understanding of the mechanism of extracellular polymeric substances of aerobic granular sludge against tetracycline from the perspective of fluorescence properties. **Science of the Total Environment**, v. 276, n. 144054, 2021.

LIANG, Z. et al. Formation, extracellular polymeric substances and microbial community of aerobic granules enhanced by microbial flocculant compared with poly-aluminum chloride. **Journal of Cleaner Production**, v. 220, p. 544–552, 2019.

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

LIN, Y. M. et al. Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. **Separation Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1642–1652, 2008.

LIN, Y. M. et al. Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant, **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3355–3364, 2010.

LIN, Y. M. et al. Sustainable polysaccharide-based biomaterial recovered from waste aerobic granular sludge as a surface coating material. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 4, p. 24–29, 2015.

LIN, Y. M.; BASSIN, J. P.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 46, n. 4, p. 986–992, 2012.

LIN, Y. M.; SHARMA, P. K.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. The chemical and mechanical differences between alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic flocculent sludge and aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 47, p. 57–65, 2013.

LIU, J. et al. Rapid aerobic granulation in an SBR treating piggery wastewater by seeding sludge from a municipal WWTP. **Journal of Environmental Sciences**, v. 51, p. 332–341, 2017.

LIU, L. et al. Investigation on the properties and kinetics of glucose-fed aerobic granular sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2–3, p. 307–313, 2005.

LIU, L. et al. Metabolic engineering and fermentation process strategies for L-tryptophan production by Escherichia coli. **Processes**, v. 7, n. 4, p. 213, 2019.

LIU, L. et al. Recovery of l-tryptophan from crystallization wastewater by combined membrane process. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 3, p. 443–449, 2009.

LIU, Y. et al. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 371–379, 2004.

LIU, Y. et al. 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, p. 520–525, 2010.

LIU, Y.; CINQUEPALMI, S. Exploration of mechanisms for calcium phosphate precipitation and accumulation in nitrifying granules by investigating the size effects of granules. **Water Research**, v. 206, n. 117753, 2021.

LIU, Y.; TAY, J. H. Influence of cycle time on kinetic behaviors of steady-state aerobic granules in sequencing batch reactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p.516–522, 2007.

LIU, Y.; TAY, J. H. Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 980–985, 2008.

LIU, Y.; TAY, J. H. State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 533–563, 2004.

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

LONG, B. et al. Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 57–63, 2014.

- LONG, B. et al. Tolerance to organic loading rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic granular reactor. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 314–322, 2015.
- LOTTI, T. et al. Extraction, recovery and characterization of structural extracellular polymeric substances from anammox granular sludge. **Journal of Environmental Management**, v. 236, p. 649–656, 2019a.
- LOTTI, T. et al. Hydrogels formed by anammox extracellular polymeric substances: structural and mechanical insights. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1–9, 2019b.
- LOURENÇO, N. D. et al. Comparing aerobic granular sludge and flocculent sequencing batch reactor technologies for textile wastewater treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 104, p. 57–63, 2015.
- LUO, J. et al. Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. **Water Research**, v. 62, p. 127–135, 2014.
- MALEKI, S. et al. New insights into *Pseudomonas fluorescens* alginate biosynthesis relevant for the establishment of an efficient production process for microbial alginates. **New Biotechnology**, v. 37, p. 2–8, 2017.
- MASZENAN, A.M.; LIU, Y.; NG, W.J. Bioremediation of wastewaters with recalcitrant organic compounds and metals by aerobic granules. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 111–123, 2011.
- MCHUGH, D.J. **A Guide to the Seaweed Industry**. Roma: FAO Fisheries, 2003.
- MCSWAIN, B. et al. Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1051–1057, 2005.
- MENG, F. et al. Enhanced amount and quality of alginate-like exopolysaccharides in aerobic granular sludge for the treatment of salty wastewater. **BioResources**, v. 14, n. 1, p. 139–165, 2019.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. Alginate biosynthesis and biotechnological production. In: Rehm, B.H.A., Moradali, M.F. (Eds.). **Alginates and Their Biomedical Applications**. Singapura: Springer, 2018. p. 1–25.
- MORE, T. et al. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1–25, 2014.
- MORGENROTH, E. et al. Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 31, p. 3191–3194, 1997.
- MOSQUERA-CORRAL, A. et al. Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. **Water Research**, v. 39, p. 2676–2686, 2005.
- MOTTERAN, F.; PEREIRA, E.L.; CAMPOS, C.M.M. The behaviour of an anaerobic baffled reactor (ABR) as the first stage in the biological treatment of hog farming effluents. **Brazilian**



**Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 299–310, 2013.

MUDA, K. et al. The effect of hydraulic retention time on granular sludge biomass in treating textile wastewater. **Water Research**, v. 45, n. 16, p. 4711–4721, 2011.

MURALI, A.; BHARGAVA, A.; WRIGHT, E. S. IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. **Microbiome**, v. 6, n. 140, 2018.

MURUJEW, O. et al. Recovery and reuse of alginate in an immobilized algae reactor. **Environmental Technology**, v. 42, n. 1, p. 1–10, 2019.

MUSTAFA, A. et al. Perspectives of Using L-Tryptophan for Improving Productivity of Agricultural Crops: A Review. **Pedosphere**, v. 28, n. 1, p. 16–34, 2018.

NANCHARAI, Y. V.; KUMAR, G. K. Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1128–1143, 2018.

NIU, H. et al. Metabolic engineering for improving l-tryptophan production in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 55–65, 2019.

OEHMEN, A. et al. Short-term effects of carbon source on the competition of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 10, p. 139–144, 2004.

OPITECK, G. J. et al. Comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for the isolation of overexpressed proteins and proteome mapping. **Analytical Biochemistry**, v. 258, n. 2, p. 349–361, 1998.

PELTRE, C. et al. Repeated application of organic waste affects soil organic matter composition: Evidence from thermal analysis, FTIR-PAS, amino sugars and lignin biomarkers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 104, p. 117–127, 2017.

PORTER, R. J. et al. Tryptophan and tyrosine availability and response to antidepressant treatment in major depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 86, n. 2–3, p. 129–134, 2005.

PRONK, M. et al. Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 5257–5268, 2015.

PRONK, M. et al. The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *Deffluviicoccus* sp. **Water Research**, v. 122, p. 148–158, 2017.

QIU, B. et al. Rapid granulation of aerobic granular sludge and maintaining its stability by combining the effects of multi-ionic matrix and bio-carrier in a continuous-flow membrane bioreactor. **Science of the Total Environment**, v. 813, n. 152644, 2022.

QIULAI, H. et al. A comprehensive comparison between non-bulking and bulking aerobic granular sludge in microbial communities. **Bioresource Technology**, v. 294, n. 122151, 2019.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2013.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. Bacterial alginates: From biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 21, p. 1701–1712, 2006.

ROAGER, H. M.; LICHT, T. R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. **Nature Communications**, v. 9, n. 3294, 2018.

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 678–688, 2018.

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Evaluation of the production of alginate-like exopolysaccharides (ALE) and tryptophan in aerobic granular sludge systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 2, p. 259–270, 2020b.

ROLLEMBERG, S. L. S. et al. Pilot-scale aerobic granular sludge in the treatment of municipal wastewater: Optimizations in the start-up, methodology of sludge discharge, and evaluation of resource recovery. **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123467, 2020a.

RUSANOWSKA, P. et al. Changes in extracellular polymeric substances (EPS) content and composition in aerobic granule size-fractions during reactor cycles at different organic loads. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 188–193, 2019.

SANGSOPHA, J. et al. Optimization of pasteurized milk with soymilk powder and mulberry leaf tea based on melatonin, bioactive compounds and antioxidant activity using response surface methodology. **Heliyon**, v. 5, n. 11, 2019.

SCHAMBECK, C. M. et al. Biopolymers recovery: dynamics and characterization of alginate-like exopolymers in an aerobic granular sludge system treating municipal wastewater without sludge inoculum. **Journal of Environmental Management**, v. 263, n. 110394., 2020.

SEVIOUR, T. et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis. **Water Research**, v. 151, p. 1–7, 2018.

SHEN, N.; ZHOU, Y. Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 11, p. 4735–4745, 2016.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H. Aerobic granulation: advances and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 167, p. 1622–1640, 2012.

SILVA, L. C. F. et al. Heterotrophic nitrifying/aerobic denitrifying bacteria: Ammonium removal under different physical-chemical conditions and molecular characterization. **Journal of Environmental Management**, v. 248, n. 109294, 2019.

SNYDER, H. R.; SMITH, C. W. A convenient synthesis of dl-tryptophan. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, p. 350–351, 1944.

SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. An insight into the ecology, diversity and

adaptations of *Gordonia* species. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 393–413, 2018.

STURM, B. S. M.; IRVINE, R. L. Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. **Water Science and Technology**, v. 58, p. 781–787, 2008.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: current use and future perspectives in pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, n. 8, p. 1–17, 2016.

TANG, C. J. et al. Removal of nitrogen from wastewaters by anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) using granules in upflow reactors. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, p. 311–328, 2017.

TAY, J. H.; LIU, Q. S.; LIU, Y. The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 222–226, 2001.

TOUR KAUMERA NEREDA GUM. Waterschap Rijn em IJssel, 2020. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=btpj73u8qTI>>. Acesso em: 11 ago. 2020.

TSUNEDA, S. et al. Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. **Water Research**, v. 37, p. 4965–4973, 2003.

TU, X. et al. Fractionation and characterization of dissolved extracellular and intracellular products derived from floccular sludge and aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 55–61, 2012.

VAN DER ROEST, H. et al. Recovery and reuse of alginate from granular Nereda sludge. **Water21 magazine**, v. 21, p. 48, 2015.

VAN LEEUWEN, K. et al. The energy & raw materials factory: Role and potential contribution to the circular economy of the Netherlands. **Environmental Management**, v. 61, n. 5, p. 786–795, 2018.

VAN VEEN, J. F. et al. Tryptophan depletion affects the autonomic stress response in generalized social anxiety disorder. **Psychoneuro endocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1590–1594, 2009.

VERAWATY, M. et al. Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. **Water Research**, v. 47, n. 14, p. 5338–5349, 2013.

WAN, C. et al. Calcium precipitate induced aerobic granulation. **Bioresource Technology**, v. 176, p. 32–37, 2015.

WAN, C. et al. Disintegration of aerobic granules: Role of second messenger cyclic di-GMP. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 330–333, 2013.

WAN, C. et al. Formation of bacterial aerobic granules: Role of propionate. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 489–494, 2015.

WANG, B. B. et al. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wines during

fermentation and evaluation of matrix effect. **Food Chemistry**, v. 163, p. 6–15, 2014.

WANG, C. et al. Potential coupling effects of ammonia-oxidizing and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria on completely autotrophic nitrogen removal over nitrite biofilm formation induced by the second messenger cyclic diguanylate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 3821–3828, 2017.

WANG, L. et al. Synergy of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone and tryptophan-like outer extracellular substances in granular sludge dominated by aerobic ammonia-oxidizing bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 10779–10789, 2018.

WANG, Z. et al. The influence of short-term starvation on aerobic granules. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2373–2378, 2006.

WANG, Z.; YANG, H.; ZHU, Z. Study on the blends of silk fibroin and sodium alginate: Hydrogen bond formation, structure and properties. **Polymer**, v. 163, p. 144–153, 2019.

WATANABE, T.; SNELL, E. E. Reversibility of the tryptophanase reaction: synthesis of tryptophan from indole, pyruvate, and ammonia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 5, p. 1086–1090, 1972.

WINKLER, M. K. H. et al. Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 7447–7458, 2013.

WINKLER, M. K. H. et al. Selective sludge removal in a segregated aerobic granular biomass system as a strategy to control PAO-GAO competition at high temperatures. **Water Research**, v. 45, n. 11, p. 3291–3299, 2011.

WONG, L. L. et al. Isolation of a putative S-layer protein from anammox biofilm extracellular matrix using ionic liquid extraction. **BioRxiv**, n. 705566, 2019.

WONG, L. L. et al. Extracellular protein isolation from the matrix of anammox biofilm using ionic liquid extraction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 3643–3654, 2020.

WRIGHT, E. S. Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. **The R Journal**, v. 8, n. 1, p. 352–359, 2016.

WU, J. et al. Impacts of hydrodynamic shear force on nucleation of flocculent sludge in anaerobic reactor. **Water Research**, v. 43, p. 3029–3036, 2009.

WU, L. et al. Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 2, p. 234–241, 2012.

XIAO, K.; ZHOU, Y. Protein recovery from sludge: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 249, n. 119373, 2020.

XU, J. et al. Effects of chronic exposure to different sizes and polymers of microplastics on the characteristics of activated sludge. **Science of the Total Environment**, v. 783, n. 146954,

2021.

XUE, W. et al. 2019. Recovery of high-value and scarce resources from biological wastewater treatment: Sulfated polysaccharides. **Water Research**, v. 163, n. 114889, 2019.

YAN, L. et al. Tetracycline removal in granulation: Influence of extracellular polymers substances, structure, and metabolic function of microbial community. **Chemosphere**, v. 288 (Pt 2), n. 132510, 2022.

YANG, Y. C. et al. Accelerated aerobic granulation using alternating feed loadings: Alginate-like exopolysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 360–366, 2014.

YU, Z. et al. Enhancement of PPCPs removal by shaped microbial community of aerobic granular sludge under condition of low C/N ratio influent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 394, n. 122583, 2020.

ZHANG, B. et al. A sustainable strategy for effective regulation of aerobic granulation: Augmentation of the signaling molecule content by cultivating AHL-producing strains. **Water Research**, v. 169, n. 115193, 2020.

ZHANG, L. et al. Evolution of microbial community during dry storage and recovery of aerobic granular sludge. **Heliyon**, v. 5, n. 12 (e03023), 2019.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. J. Aerobic granular processes: Current research trends. **Bioresource Technology**, v. 210, p. 74–80, 2016.

ZHANG, Y. et al. Effects of substrate shock on extracellular polymeric substance (EPS) excretion and characteristics of attached biofilm anammox granules. **RSC Advances**, v. 6, p. 113289–113297, 2016.

ZHANG, Z. et al. Stability of aerobic granular sludge under condition of low influent C/N ratio: correlation of sludge property and functional microorganism. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 391–399, 2018a.

ZHANG, Z. et al. Understanding of aerobic sludge granulation enhanced by sludge retention time in the aspect of quorum sensing. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 226–234, 2018b.

ZHU, L. et al. Specific component comparison of extracellular polymeric substances (EPS) in flocs and granular sludge using EEM and SDS-PAGE. **Chemosphere**, v. 121, p. 26–32, 2015.

ZOU, H. et al. Role of nitrate in biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 701–706, 2006.