UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL
TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS

ELISSANDRA CHEU PEREIRA DO NASCIMENTO

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE LODO GRANULAR AERÓBIO E DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO

Recife
2022

ELISSANDRA CHEU PEREIRA DO NASCIMENTO

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE LODO GRANULAR AERÓBIO E DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil e Ambiental. Área de Concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.

Coorientador: Prof. Dr. Fabricio Motteran.

Recife

2022

Catalogação na fonte
Bibliotecária Maria Luiza de Moura Ferreira, CRB-4 / 1469

N244r Nascimento, Elissandra Cheu Pereira do.
Recuperação de bioprodutos de lodo granular aeróbio e de consórcio granular algal-bacteriano / Elissandra Cheu Pereira do Nascimento. - 2022.
90 folhas, il.; tab., abr. e sigl.

Orientador: Prof. Dr. Mario Takayuki Kato.
Coorientador: Prof. Dr. Fabricio Motteran.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, 2022.
Inclui Referências.

1. Engenharia Civil. 2. Recuperação de recursos. 3. Lodo granular aeróbio (LGA). 4. Exopolímero semelhante a alginato (ALE). 5. Polihidroxialcanoato (PHA). 6. Produção lipídica. I. Kato, Mario Takayuki. (Orientador). II. Motteran, Fabricio (Coorientador). III. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.) BCTG/2022-57

ELISSANDRA CHEU PEREIRA DO NASCIMENTO

RECUPERAÇÃO DE BIOPRODUTOS DE LODO GRANULAR AERÓBIO E DE CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTERIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil. Área de Concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em 17/02/2022

BANCA EXAMINADORA

_____

Participação por videoconferência
Prof. Dr. Fabricio Motteran (coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Participação por videoconferência
Profa. Dra. Lorena Bittencourt Guimarães Thibau (examinadora externa)
Centro Universitário do Planalto de Araxá

_____

Participação por videoconferência
Dr. Osmar Luiz Moreira Pereira Fonseca de Menezes (examinador externo)
The University of Arizona

_____

Participação por videoconferência
Profa. Dra. Bruna Scandolara Magnus (examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais Lucia e Martinez, ao meu irmão Sanderley Pereira (*in memorian*) e ao meu noivo Aluisio Pereira pela força, motivação diária e apoio oferecido em toda minha jornada acadêmica e de vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por ter me proporcionado saúde, força e coragem para superar as dificuldades.

À família e amigos, em especial à minha mãe, Lucia Pereira pelos cuidados que sempre teve comigo, e ao meu pai, Martinez Pereira, homem de notório caráter, pelo amor, dedicação e compreensão. Sou grata também aos meus irmãos: Elisângela Pereira, Vanderlucia Pereira, Mateus Pereira e Luiz Fernando Pereira pela paciência e compreensão nos dias em que não pude estar aos vossos lados.

Ao meu noivo e companheiro de vida, Aluisio Pereira, por sempre acreditar em meu potencial, pela paciência, motivação e perseverança diária e, principalmente por ser meu guia nos dias nublados.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Takayuki Kato, um exemplo de profissional, pela disponibilidade, ensinamentos e confiança depositada no meu trabalho. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fabricio Motteran pelos ensinamentos, ajuda, confiança e paciência. Aos professores Dr. Wanderli Leite, Dr.ª Sávia Gavazza, Dr.ª Bruna Fernandes e em especial, as professoras Dr.ª Lourdinha Florêncio e Dr.ª Bruna Magnus, profissionais inspiradoras, pela sabedoria, dedicação, paciência e confiança na condução deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório, Ronaldo Fonseca, Danúbia Freitas e Iago por todo carinho e suporte técnico, e às secretárias do curso de Pós-Graduação por todo apoio concebido.

À Família LSA, em especial, ao grupo de pesquisa de lodo granular, a Marcos Sales e Henrique César pela parceria nesse trabalho. Vocês tornaram os meus dias mais leves. A Oucilane, Babi, Talita, Antônio, Wagner, Josivaldo, Emylaine, Marcos Vinicius, Ana Alice, Luiz Pereira, Italo, Sérgio, Kamila, Tati, Jucélia, Marilia, Alfredo, Davson, Edilberto, Sayonara, Shirlane, Thaise, Nathália, Anny, Paulo, Joelithon e tantos outros que me ajudaram, pela companhia e discussões científicas.

À Compesa e BRK Ambiental, FACEPE, FINEP, CNPq, INCT ETE's Sustentáveis e Fibra Técnica Ltda pelo apoio e cooperação técnica ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da UFPE. Em especial a CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O gerenciamento do lodo biológico excedente produzido em estações de tratamento de esgoto pode representar mais de 50% dos custos operacionais de uma ETE. Associado a isto, a destinação inadequada desse resíduo em lixões e aterros sanitários controlados são vistos como um problema ambiental que acarreta em prejuízos para o meio ambiente e saúde pública. Nesse sentido, a busca por novas tecnologias de valorização deste resíduo deve ser priorizada. Diante desse cenário, essa pesquisa teve quatro objetivos que visam aprofundar os conhecimentos quanto a valorização do lodo através da tecnologia de lodo granular aeróbio (LGA) e do lodo granular algal-bacteriano (LGAB): (1) analisar a formação de grânulos e fotogrânulos aeróbios; (2) quantificar a recuperação dos biopolímeros (ALE e PHB) em sistemas LGA e LGAB, assim como a produção lipídica em LGAB; (3) avaliar o efeito do modo de operação na recuperação de ALE, PHB e lipídios nos sistemas mencionados e (4) elucidar a comunidade microbiológica na produção desses subprodutos em LGA. Para isso, foram operados quatro reatores em bateladas sequencias em escala de bancada, sendo dois reatores com biomassa bacteriana (R1 e R2) e dois biorreatores com consórcio microalgal-bacteriano (F1 e F2) com ciclos de 4h, durante 70 dias. Os reatores foram submetidos a duas estratégias operacionais de mistura da biomassa: pulsos de ar (R1 e F1) e recirculação do sobrenadante (R2 e F2). Os reatores foram alimentados com efluente sintético complexo (DQO=280,8 ± 53,6 mg/L) sob clima tropical (29,0 ± 2,0 °C). Os resultados indicaram que a estratégia de mistura da biomassa por pulsos de ar favoreceu a produção/recuperação de ALE para biomassa bacteriana (R1: 172,4 ± 94,6 mg/gSSV) quando comparados à estratégia de recirculação do esgoto sobrenadante (R2: 63,7 ± 44,0 mg/gSSV). Por outro lado, não houve diferenças significativas na recuperação de ALE entre as estratégias aplicadas para biomassa algal-bacteriana (F1: 84,3 ± 32,7 mg/gSSV e F2: 90,9 ± 51,3 mg/gSSV). As análises demonstraram que organismos responsáveis pela excreção de EPS do gênero *Lactococcus*, foram dominantes nos reatores bacterianos, superiores a 40%. Quanto à recuperação de PHB, foi demonstrado que os reatores bacterianos apresentaram maior potencial de acumulação de PHB (10,4 ± 1,7 mg/gSSV para R1 e 7,9 ± 4,5 mg/gSSV para R2) quando comparados aos de biomassa algal-bacteriano (5,7 ± 1,6 mg/gSSV e 6,3 ± 0,8 mg/gSSV em F1 e F2, respectivamente). Por fim, a produção lipídica alcançada em F1 (pulsos de ar) foi

aproximadamente 40% superior ao F2 (recirculação do sobrenadante), que obtiveram cerca de 205,5±87,6 mg/gSSV e 120,3±71,0 mg/gSSV, respectivamente. Os dados mostraram o potencial de recuperação de biopolímeros (ALE e PHB) em LGA e LGAB e de produção lipídica em LGAB. Entretanto, faz-se necessário sua aplicação em escala piloto e/ou real a fim de avaliar sua aplicabilidade e viabilidade operacional para fins de implementação em biorrefinarias.

Palavras-chave: recuperação de recursos; lodo granular aeróbio (LGA); exopolímero semelhante a alginato (ALE); polihidroxialcanoato (PHA); produção lipídica.

ABSTRACT

The management of surplus biological sludge produced in Wastewater Treatment Plants (WWTP's) can represent more than 50% of the operational costs of WWTPs. Associated with this, the inadequate destination of this residue in dumps and controlled sanitary landfills are seen as an environmental problem that causes damage to the environment and public health. In this sense, the search for new technologies for the recovery of this waste should be prioritized. In this scenario, this research had four objectives that aim to deepen the knowledge regarding the valorization of sludge through aerobic granular sludge (AGS) and algal-bacterial sludge (AGSB) technology: (1) to analyze the formation of granules and photogranules aerobics; (2) quantify the recovery of biopolymers (ALE and PHB) in AGS and AGSB systems, as well as lipid production in AGSB; (3) to evaluate the effect of the operation mode on the recovery of ALE, PHB and Lipids in AGS and AGSB and (4) to elucidate the microbiological community in the production of these by-products in AGS. For this, four reactors were operated in sequential batches on bench scale, two reactors with bacterial biomass (R1 and R2) and two bioreactors with a microalgal-bacterial consortium (F1 and F2) with cycles of 4h during 70 days of operation. The reactors were subjected to two operational strategies for biomass mixing: air pulses (R1 and F1) and supernatant recirculation (R2 and F2). The reactors were fed with complex synthetic effluent (COD=280.8 ± 53.6 mg/L) under tropical climate (29.0 ± 2.0 °C). The results indicated that the strategy of mixing the biomass by air pulses favored the production/recovery of ALE for bacterial biomass (R1: 172.4 ± 94.6 mg/gSSV) when compared to the strategy of recirculating the supernatant sewage (R2: 63.7 ± 44.0 mg/gSSV). On the other hand, there were no significant differences in ALE recovery between the strategies applied to algal-bacterial biomass (F1: 84.3 ± 32.7 mg/gSSV and F2: 90.9 ± 51.3 mg/gSSV). The analyzes showed that organisms responsible for the excretion of EPS of the *Lactococcus* genus were dominant in bacterial reactors, greater than 40%. Regarding PHB recovery, it was demonstrated that bacterial reactors had a greater potential for PHB accumulation (10.4 ± 1.7 mg/gSSV for R1 and 7.9 ± 4.5 mg/gSSV for R2) when compared to those of algal-bacterial biomass (5.7 ± 1.6 mg/gSSV and 6.3 ± 0.8 mg/gSSV in F1 and F2, respectively). Finally, the lipid production achieved in F1 (air pulses) was approximately 40% higher than in F2 (supernatant recirculation), which obtained about 205.5±87.6 mg/gSSV and 120.3±71.0 mg /gSSV, respectively.

The data showed the potential for recovery of biopolymers (ALE and PHB) in AGS and AGSB and lipid production in AGSB. However, its application on a pilot and/or real scale is necessary to assess its applicability and operational feasibility for implementation in biorefineries.

Keywords: resource recovery; aerobic granular sludge (AGS); *alginate-like exopolymer* (ALE); polyhydroxyalkanoate (PHA); lipid production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática simplificada da tecnologia de A) lodo ativado e B) lodo granular aeróbio..... 21
Figura 2 - Representação esquemática da formação de grânulos..... 22
Figura 3 - Ilustração da interação de microalgas-bactérias na formação do biofilme granular..... 24
Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento de um RBS 26
Figura 5 - Layout do esquema operacional dos reatores bacterianos (a) e consórcio (b) 33
Figura 6 - Estratégia operacional aplicado 36
Figura 7 - Análise de IVL de 10 e 30 min para R1 e R2 38
Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento de extração de ALE da biomassa granular 41
Figura 9 - Extração de lipídios 43
Figura 10 - Concentração de SSVLM (a) e idade do lodo (b) em R1 e R2 46
Figura 11 - Distribuição granulométrica da biomassa dos reatores R1(a) e R2 (b) 48
Figura 12 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x 50
Figura 13 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x 51
Figura 14 - Microrganismos identificados utilizando microscopia óptica em R1 52
Figura 15 - Microrganismos identificados utilizando microscopia óptica em R2 52
Figura 16 - Concentração de SSVLM em F1 e F2 53
Figura 17 - Distribuição granulométrica da biomassa dos reatores F1(a) e F2(b) 57
Figura 18 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do F1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x 58

Figura 19 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do F2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x 59
Figura 20 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no F1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x 61
Figura 21 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no F2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x 61
Figura 22 - Variação das concentrações de clorofila-a durante operação 62
Figura 23 - “Efeito parede” nos fotobiorreatores (indicados por setas) 63
Figura 24 - Conteúdo de ALE no EPS em (a) R1 e R2, e (b) F1 e F2 64
Figura 25 - Comparação do conteúdo de ALE no EPS em (a) R1 e F1, e (b) R2 e F2 65
Figura 26 - Comparação do conteúdo de ALE na Biomassa em (a) R1 e R2, e (b) F1 e F2 67
Figura 27 - Perfil de matéria orgânica (DQO), fosfato e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em R1 (a) e R2 (b) 69
Figura 28 - Perfil de matéria orgânica (DQO), fosfato e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em F1 (a) e F2 (b) 70
Figura 29 - Concentração de AGV em R1 (a) e R2 (b) no dia 65 71
Figura 30 - Concentração de AGV em F1 (a) e F2 (b) no dia 65 72
Figura 31 - Produção Lipídica nos fotobiorreatores F1 e F2 73
Figura 32 - Dinâmica da composição da comunidade microbiana em inóculo, R1-1 e R2-1 (29° dia) e R1-2 e R2-2 (64° dia) de operação 75
Figura 33 - Resumo esquemático dos principais resultados 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do afluente sintético 35
Tabela 2 - Solução de micronutrientes 35
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos monitorados 37
Tabela 4 - Características do esgoto doméstico sintético 44
Tabela 5 - Concentrações de IVL_{10}, IVL_{30} e IVL_{30}/IVL_{10} em R1 e R2..... 47
Tabela 6 - Concentrações de IVL_{10}, IVL_{30} e IVL_{30}/IVL_{10} em F1 e F2 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ALE	*Alginate-like Exopolymers* (Exopolímero semelhante ao Alginato)
Cla-a	Clorofila a
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPS	*Extracellular Polymeric Substances* (Substâncias Poliméricas Extracelulares)
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
F1	FRBS1
F2	FRBS2
FRBS	Fotobioreator em Bateladas Sequenciais
GAO	*Glycogen Accumulating Organisms* (Organismos Acumuladores de Glicogênio)
IVL	Índice Volumétrico de Lodo
LGA	Lodo Granular Aeróbio
LGAB	Lodo Granular Algal-Bacteriano
PAO	*Polyphosphate-Accumulating Organisms* (Organismos Acumuladores de Fosfato)
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
R1	RBS1
R2	RBS2

RBS	Reatores em Bateladas Sequenciais
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
SSVLM	Sólidos Suspensos do Licor Misto

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**17**
1.1	OBJETIVO GERAL	18
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2	**REFERENCIAL TEÓRICO**	**20**
2.1	BIORREFINARIA E ECONOMIA CIRCULAR	20
2.2	LODO GRANULAR AERÓBIO	21
2.2.1	**Formação de grânulos Aeróbios**	**22**
2.3	CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTÉRIANO	23
2.3.1	**Formação de fotogrânulos aeróbios**	**24**
2.4	REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS	25
2.5	RECUPERAÇÃO DE SUBPRODUTOS EM LGA e LGAB	27
2.5.1	**Exopolímero semelhante ao Alginato (ALE)**	**27**
2.5.2	**Polihidroxialcanoato (PHA)**	**29**
2.5.3	**Lipídios**	**30**
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**	**32**
3.1	SISTEMA EXPERIMENTAL	32
3.1.1	**Inóculo microbiano e efluente sintético**	**34**
3.2	ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS	36
3.3	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO MONITORAMENTO DOS REATORES	37
3.3.1	**Análises físico-químicas**	**37**
3.3.2	**Índice Volumétrico do Lodo e microscopia**	**38**
3.3.3	**Análise granulométrica**	**39**
3.3.4	**Análise de Clorofila-a**	**39**
3.4	EXOPOLÍMERO SEMELHANTE AO ALGINATO (ALE)	40
3.5	POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)	41
3.6	LIPÍDIOS	42
3.7	BIOLOGIA MOLECULAR	43
4	**RESULTADOS E DISCUSSÕES**	**44**
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO AFLUENTE SINTÉTICO	44

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS 44
4.2.1 Formação de grânulos aeróbios 45
4.2.1.1 Sólidos e IVL 45
4.2.1.2 Distribuição granulométrica da biomassa 47
4.2.1.3 Desenvolvimento da biomassa 49
4.2.2 Formação de Fotogrânulos 53
4.2.2.1 Sólidos e IVL 53
4.2.2.2 Distribuição granulométrica da biomassa 55
4.2.2.3 Desenvolvimento da biomassa e população microbiana 57
4.2.2.4 Clorofila-a 62
4.3 EXOPOLÍMERO SEMELHANTE A ALGINATO (ALE) 63
4.4 CONTEÚDO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) 67
4.5 PRODUÇÃO LIPÍDICA 72
4.6 DINÂMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA 74
5 DISCUSSÃO INTEGRADA 77
6 CONCLUSÕES 80
7 RECOMENDAÇÕES 81
REFERÊNCIAS 82

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o manuseio e descarte do lodo proveniente das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) é considerado um problema ambiental, pois conforme Nizami *et al.* (2017), na maioria dos países em desenvolvimento, o lodo biológico residual é descartado em lixões ou aterros sanitários sem qualquer controle ou regulamentação. Em contraste a isso, países europeus exigem que estes compostos sejam utilizados para produção de energia ou submetidos a processos para recuperação de subprodutos de alto valor agregado por meio do lodo excedente ao abrigo da Diretiva Quadro para Resíduos: Diretiva 2008/98/EC (HEALY *et al*., 2015).

A partir de iniciativas como essas, conforme discorre Guimarães (2017), as ETE passaram a ser vistas como potenciais biorrefinarias, modeladas para recuperação de produtos de alto valor agregado a partir do lodo excedente em quantidades e custos compatíveis com a demanda e preços do mercado (Van Loosdrecht e Brdjanovic, 2014).

Atualmente, a tecnologia de lodo ativado é o tratamento biológico de águas residuárias mais utilizado no mundo (VAN HAANDEL; VAN DER LUBBE, 2012). No entanto, quando se visa a remoção de nutrientes, são necessárias diversas operações unitárias, o que resulta em maiores custos de instalação e operação, e demanda área. Nesse contexto, algumas tecnologias emergentes de tratamento de efluentes estão surgindo, como a de Lodo Granular Aeróbio (LGA). No Brasil, três estações já operam com o sistema LGA, em Rio Claro (SP), Limeira (SP) e no Rio de Janeiro (RJ), e outras unidades estão em fase de projeto e construção, como em Recife (PE) e no Tocantins, implantadas pela BRK Ambiental.

Nesse cenário, pesquisas vêm revelando que o LGA tem se mostrado uma abordagem vantajosa para o tratamento de esgotos sanitários devido ao potencial de tratar efluentes com menor custo e promover remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes em um mesmo tanque (reator biológico). Além disso, diversos subprodutos de alto valor agregado e interesse comercial podem ser obtidos a partir do LGA, como: exopolímero semelhante ao alginato (ALE), polihidroxialcanoato (PHA), triptofano e fósforo, e recentemente, vem-se explorando a capacidade de biorreatores de consórcio algal-bacteriano (LGAB) na produção lipídica (HUANG *et al.*, 2020).

Em síntese, temos que:

a) O ALE é um biopolímero testado em aplicações farmacêuticas, biomédicas avançadas, indústria de alimentos e papel (CAO *et al*., 2020; MORADALI *et al*., 2018), seu valor de mercado pode variar entre US$ 80-140/Kg (MURUJEW *et al.* 2019);
b) O polihidroxialcanoato (PHA) são considerados como bioplásticos produzidos intracelularmente por microrganismos removedores de fósforo (MANNINA *et al*., 2019) que pode ser usado na produção de embalagens, tintas, fibras ultra-fortes, produtos da biomedicina (MOZEJKO-CIESIELSKA e KIEWISZ, 2016), e apresenta valor de mercado variando de US$ 1,74-5,97/Kg de PHA (KUMAR *et al*., 2020);
c) O lipídio, matéria-prima para produção de biocombustíveis tornou-se uma alternativa aos combustíveis tradicionais devido ao menor balanço geral de emissões de gases de efeito estufa (YELLAPU *et al*., 2018).

A recuperação dos bioprodutos por meio da biomassa granular e consórcio algal-bacteriano são alternativas possíveis (FELZ *et al*., 2016; SCHAMBECK *et al*., 2020; ROLLEMBERG *et al*., 2020a; MENG, *et al*., 2020). Nesse contexto, essa tecnologia acarreta em alto impacto no âmbito do desenvolvimento científico e tecnológico, visto que é um processo de tratamento de esgoto que apresenta elevadas eficiências de remoção de matéria orgânica, nutrientes e potencial de recuperação de recursos de valor agregado do excesso de lodo (biomassa). No entanto, além de otimizar os sistemas LGA e LGAB para produção em larga escala, é preciso ampliar o conhecimento sobre o impacto dos parâmetros operacionais na recuperação de recurso neste sistema (CARVALHO *et al*., 2021).

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial de recuperação dos biopolímeros ALE e PHB em LGA e LGAB cultivados em reatores em bateladas sequenciais (RBS) em escala de bancada, assim como quantificar a produção lipídica por LGAB.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a formação de grânulos aeróbios e fotogrânulos em diferentes condições operacionais;

- Quantificar a produção e recuperação dos biopolímeros ALE e PHB em LGA e LGAB, assim como a produção lipídica em LGAB;
- Analisar o efeito do modo de operação na recuperação de ALE, PHB em LGA e LGAB, e da produção lipídica em LGAB;
- Identificar a comunidade microbiológica envolvidos na produção dos bioprodutos em LGA por meio de técnicas de biologia molecular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Nesta seção, serão discutidos conceitos básicos para contextualizar os resultados obtidos ao longo desta pesquisa.

2.1 BIORREFINARIA E ECONOMIA CIRCULAR

Nos últimos anos, a procura por fontes renováveis de matérias-primas aumentou, principalmente em função de preocupações ambientais atuais como superpopulação e esgotamento de recursos naturais, como o petróleo e aumento dos Gases de Efeito Estufa (GEE). Com isso, a bioeconomia circular se apresenta como uma estratégia eficiente de utilização de recursos para a valorização de resíduos orgânicos.

A maioria das ETE são, geralmente, projetadas apenas para fins de remoção de matéria orgânica e nutrientes dos efluentes. No entanto, recentemente, uma nova abordagem tem sido considerada. A recuperação de recursos hídricos, energéticos e de nutrientes a partir de ETE municipais fornece uma solução promissora para uma série de problemas de cunho econômico, ambiental e social prevalentes (ANSARI *et al*., 2017). Nesse contexto, pesquisadores defendem que as ETE convencionais devem ser redesenhadas como biorrefinaria que integra processos de conversão de biomassa (lodo) em produtos de valor agregado, otimizando o uso de recursos.

Diante do exposto, a utilização eficiente de resíduos orgânicos (biomassa) para a recuperação de produtos de valor agregado e energia requer tecnologias direcionadas conforme o tipo de resíduo orgânico gerado. Além da aplicação em águas residuárias municipais (FERREIRA *et al.*, 2021), o conceito de biorrefinaria tem sido aplicado em outros segmentos como águas residuárias agroindustriais (MARTINEZ-BURGOS *et al*., 2021), de laticínios (ANUNIS *et al.,* 2020), de esterco (KHOSHNEVISAN *et al.,* 2021), dentre outros.

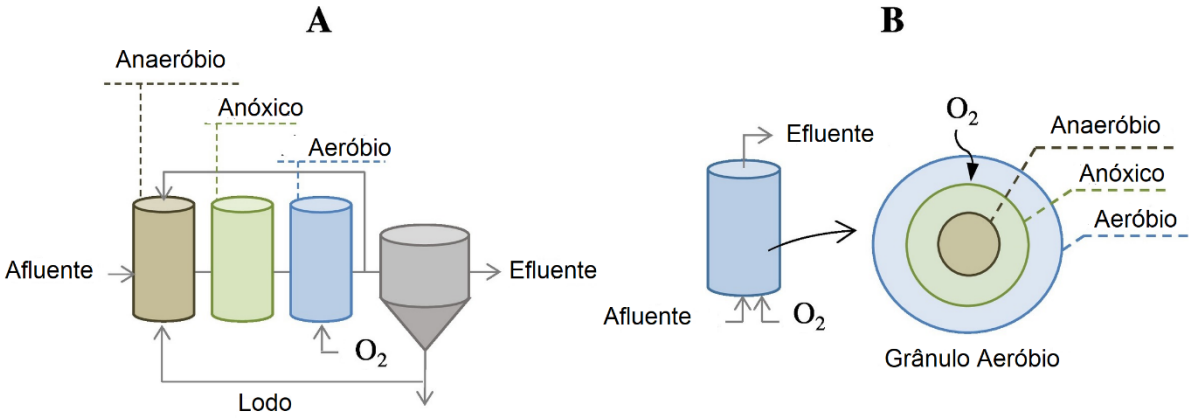
Nesse contexto, Nizami *et al.* (2017) discorre que as biorrefinarias de resíduos ou de geração de energia fornecem solução economicamente viável e promissora tanto para aumento das demandas energéticas quanto para o gerenciamento ambientalmente adequado de resíduos sólidos.

2.2 LODO GRANULAR AERÓBIO

A tecnologia de Lodo Granular Aeróbio (LGA) foi aludida pela primeira vez por Mishima e Nakamura (1991) que observaram a formação de grânulos aeróbios com diâmetros médio de 2 a 8 mm, em reator de manta de lodo aeróbio de fluxo contínuo e ascendente. Em 2004, o conceito de lodo granular aeróbio foi discutido durante o 1st IWA Workshop *on Aerobic Granular Sludge* ocorrido em Munique, Alemanha. Segundo De Kreuk *et al.* (2005), grânulos aeróbios foram oficialmente definidos como sendo um composto de agregados microbianos auto-imobilizados originados do lodo ativado convencional sujeito a tensões hidrodinâmicas específicas.

Comparado com a tecnologia de lodo ativado (Figura 1), a biomassa granular apresenta vantagens como estrutura densa e compacta, capacidade de sedimentação elevada, remoção simultânea de matéria orgânica e nutrientes (LIU; TAY, 2002). Além disso, o LGA vem demonstrando tolerância à toxicidade, suporte a altas cargas orgânicas e diferentes taxas de aeração (LONG *et al*., 2014).

Figura 1 - Representação esquemática simplificada da tecnologia de A) lodo ativado e B) lodo granular aeróbio.



Fonte: Adaptado de FRANCA *et al*. (2018).

O LGA apresenta uma estrutura estratificada decorrente da limitação de difusão de oxigênio no interior dos grânulos, denominadas zona aeróbia, anóxicas/anaeróbia (Figura 1b). Na parte superficial do grânulo encontra-se a camada aeróbia onde o oxigênio é disponível e permite o desenvolvimento de uma variedade de bactérias como as nitrificantes; no núcleo anóxico/anaeróbio ocorre o desenvolvimento de bactérias desnitrificantes e organismos acumulados de polifosfato (PAO), por exemplo (PRONK *et al*., 2015).

Em geral, a aplicação da tecnologia de LGA tem se tornado uma alternativa para estações de tratamento compactas, e vem sendo aplicada no tratamento de esgoto sanitário (PRONK *et al.,* 2015), efluente têxtil (MANAVI; KAZEMI; BONAKDARPOUR, 2017), águas residuais salinas (CORSINO *et al*., 2017), e recentemente, para recuperação de subprodutos de alto valor agregado (CARVALHO *et al*., 2021). Atualmente, o sistema com lodo granular aeróbio já vem sendo comercializado com o nome de Nereda® pela Royal Haskoning DHV em parceria com a Universidade Tecnológica de Delft (Holanda) e direcionada para a recuperação de subprodutos de alto valor agregado a partir da biomassa excedente na ETE.

2.2.1 Formação de grânulos Aeróbios

A granulação aeróbia pode ser entendida como a agregação microbiana que ocorre por um processo de imobilização para formar uma associação multicelular estável e contínua. Show, Lee e Tay *et al.* (2012) sugeriram que a granulação aeróbia só pode ser obtida sob condições de carregamentos controlados e estratégias de funcionamento específicas. O processo de formação de LGA a partir da adição de um inóculo (biomassa inicial) está relacionado à síntese de Substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que confere a adesão aos agregados e torna possível a estrutura granular, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da formação de grânulos

Fonte: Adaptado de FRANCA *et al*. (2018).

Processos detalhados de granulação foram descritos por pesquisadores como Beun *et al.* (1999), e Liu e Tay (2002) adaptado por Zhang *et al.* (2016). O modelo proposto por Liu e Tay (2002) para o desenvolvimento do LGA consiste em quatro

etapas, a saber: a primeira etapa é o contato célula-célula para formar agregado por forças hidrodinâmicas, difusivas, termodinâmica, de gravidade e de mobilidade celular; a atração inicial forma agregados por forças físicas (força de Van der Waals, neutralização de cargas opostas e força termodinâmica), químicas (união iônica, intercalação de partículas) ou bioquímicas (fusão de membrana celular, atração de receptores celulares, desidratação da superfície celular); a terceira etapa consiste na produção EPS e crescimento do agregado estimulados por *quórum sensing* e estresses ambientais como limitação de nutrientes. E, finalmente, a força de cisalhamento hidrodinâmico estabiliza a estrutura tridimensional do grânulo.

A formação do grânulo e seu tamanho influencia diretamente no desempenho do sistema LGA que dependem das condições operacionais impostas e, principalmente, da composição da água residuária utilizada. Nesse contexto, a granulação aeróbia a curto e longo prazos pode ser afetada por vários parâmetros operacionais, tais como inóculo, composição do substrato, taxa de carregamento, estratégias operacionais e de alimentação, intensidade de aeração (forças de cisalhamento hidrodinâmicas), tempo de sedimentação, relação de troca volumétrica, dentre outros (FRANCA *et al*., 2018).

2.3 CONSÓRCIO GRANULAR ALGAL-BACTÉRIANO

O setor de saneamento consome aproximadamente 7% de toda a energia do mundo (DE LIMA *et al*., 2019), o que justifica a necessidade do desenvolvimento de tecnologia eficiente com alta capacidade de remoção de matéria orgânica e nutrientes, e baixo consumo de energia. Como já é conhecido, nas ETE convencionais baseada no sistema de lodos ativados, por exemplo, as unidades de aeração que fornecem oxigênio (O_2) para o metabolismo aeróbio e para favorecer a mistura da biomassa são as grandes responsáveis pelo gasto de energia nesse sistema (AHMAD *et al*., 2019).

Diante disso, a coexistência de algas e bactérias em sistemas de tratamento de esgoto tem ganhado atenção. Nesse processo, o dióxido de carbono (CO_2) produzido pelas bactérias pode ser utilizado pelas microalgas para a fotossíntese, enquanto as microalgas produzem oxigênio para que as bactérias oxidem a matéria orgânica e o amônio (LEE e HAN, 2016). O consórcio de bactérias e microalgas pode ser desenvolvido em diferentes tipos de sistemas, como lagoas de alta taxa (ARCILA

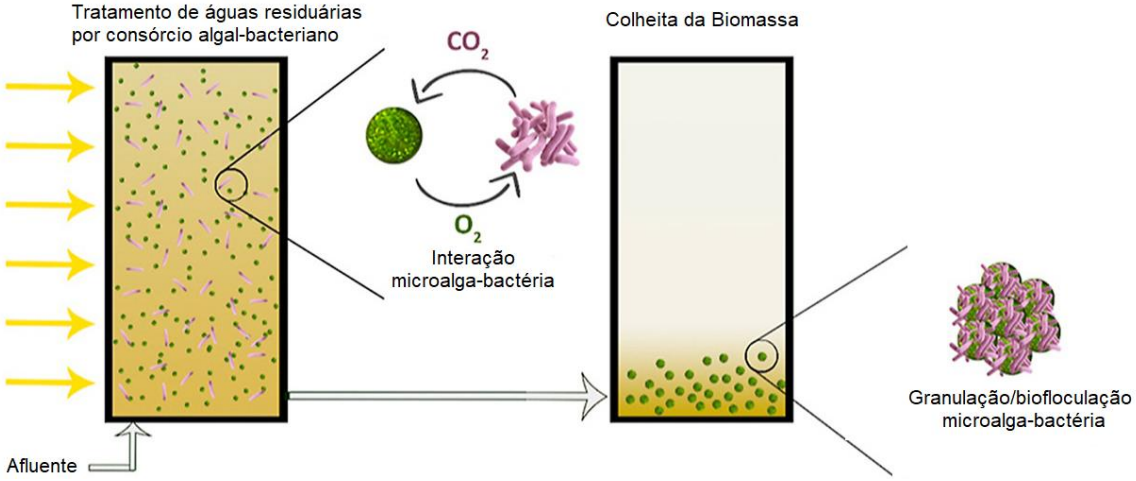
e BUITRÓN, 2017), sistemas de fluxo contínuo (JI *et al*., 2018) e fotobiorreatores fechados (LIU *et al*., 2017).

Para Zhang, Ji e Liu (2021) o processo de lodo granular algal-bacteriano (LGAB) apresenta diversas vantagens quando comparado ao processo convencional de lodos ativados, tais como: menor consumo de energia, melhor sedimentabilidade de lodo, menor emissão de GEE, além da produção da biomassa algal que pode ser utilizada na produção de bioenergia e produtos de alto valor agregado (KWON *et al*., 2014).

2.3.1 Formação de fotogrânulos aeróbios

Como mencionado anteriormente, algas e bactérias podem coexistir em sistemas de água doce e salgada, assim como em ETE quando as condições são favoráveis (AQEEL *et al*., 2016). A formação de fotogrânulos em RBS foi observado por Huang *et al.* (2015) quando o reator foi submetido a exposição natural de luz solar, promovendo o crescimento de algas e formação de grânulos por relações simbióticas entre algas e bactérias (Figura 3). Diante disso, a principal diferença entre grânulos aeróbios e fotogrânulos consiste na presença de microalgas na camada externa desse agregado (LI *et al.*, 2015).

Figura 3 - Ilustração da interação de microalgas-bactérias na formação do biofilme granular



Fonte: FALLAHI *et al*. (2021).

A formação de agregados algal-bacteriano em fotobiorreatores podem ser desenvolvidos através de processos biológicos com ou sem a adição de algas como

inóculo. Em geral, a granulação, o desempenho do sistema e a biodiversidade microbiana são influenciados por fatores microbianos, incluindo interações entre algas e bactérias. Em resumo, o modelo de desenvolvimento do agregado algal-bacteriano foi descrito por Li *et al*. (2015) e consiste em quatro estágios, a saber:

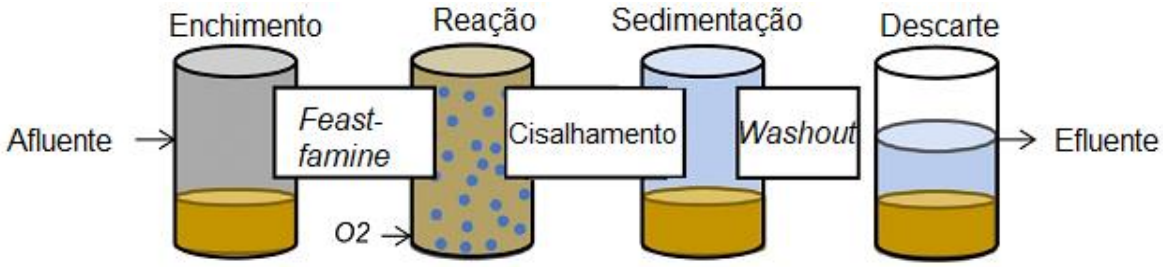
- **Estágio I:** as algas ficam aderidas à superfície do lodo floculento pela “cola biológica” (EPS) ou pela aderência de bactérias filamentosas;
- **Estágio II:** à medida que novas espécies de microalgas vão surgindo, novas bactérias ficam aderidas às algas;
- **Estágio III:** o agregado algal-microbiano continua a crescer. Nesse estágio é observado uma maior produção de EPS;
- **Estágio IV:** alcança-se a estabilidade granular.

Se comparados com o sistema de grânulos aeróbios, os fotogrânulos apresentam vantagens, tais como: redução dos custos e consumo de energia associados a simbiose entre algas e bactérias, e consequentemente redução da necessidade de oxigênio no sistema; aumento da eficiência de remoção de nutrientes, excelente sedimentabilidade, o que facilita a separação entre biomassa e efluente tratado e, apresenta potencial de recuperação de recursos de valor agregado como astaxantina, betacaroteno, AGV’s e lipídeos (FOLADORI *et al.*, 2018; HUANG *et al*., 2015; MENG *et al.,* 2019).

2.4 REATORES EM BATELADAS SEQUENCIAIS

Os grânulos aeróbios são geralmente cultivados em reatores em bateladas sequenciais (RBS) onde ocorrem aeração e decantação no mesmo tanque, sem necessidade de unidades operacionais distintas para estas etapas. Apesar do desenvolvimento de LGA acontecer preferencialmente em RBS, também é possível sua formação em sistemas contínuos (YAN, CUI e HUANG, 2021). A Figura 4 ilustra o funcionamento esquemático de um RBS.

Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento de um RBS



Fonte: Adaptado de FRANCA *et al*. (2018).

Segundo DE KREUK (2006), o RBS é um sistema que envolve a utilização de um único reator de mistura completa, o qual simula todos os processos envolvidos no sistema de lodos ativados (Figura 1a) e consequentemente, ideais para locais com limitação de espaço. Em geral, os RBS operam em regime de ciclos, com fluxo intermitente, conforme Figura 4. O processo de tratamento de esgoto nesses reatores consiste nas etapas de enchimento ou alimentação, reação, sedimentação, descarte e repouso, a saber:

- Enchimento ou alimentação: consiste da adição do efluente contendo o substrato para a atividade microbiana;
- Reação: é ligado o sistema de aeração para oxidação biológica da matéria orgânica;
- Sedimentação: interrompe-se a aeração para repouso do efluente sem interferência de entrada e saída de líquidos;
- Descarte: o efluente clarificado é retirado durante a fase de esvaziamento;
- Repouso: a biomassa permanece em repouso até que um novo ciclo se reinicie.

Apesar das vantagens desse sistema, o RBS convencional apresenta algumas limitações, tais como: necessidade de automatizar a válvula de descarga; perda de biomassa e inundação da ETE, se houver falha no descarte, dado que o tempo entre o descarte e alimentação são curtos; necessidade de bombas de elevada potência devido à vazão necessária para alimentação em curto intervalo de tempo (ROLLEMBERG *et al*., 2020b).

Assim como os RBS, os fotobiorreatores em bateladas sequenciais (FRBS) utilizam os mesmos ciclos de enchimento, reação biológica, sedimentação e esvaziamento do efluente, porém necessitam de iluminação em seus processos (JI *et al*., 2018). Os FRBS têm sido utilizados no desenvolvimento de agregados de lodo granular aeróbio e microalga (GAO *et al*., 2011).

2.5 RECUPERAÇÃO DE SUBPRODUTOS EM LGA E LGAB

Nos últimos anos, as águas residuárias deixaram de se tornar preocupação ambiental e de saúde pública e passaram a ser vistas como fonte de recuperação de subprodutos de valor agregado em apoio a uma economia circular sustentável. Nesse contexto, a atenção se voltou para a conversão de ETE em biorrefinarias devido à escassez de alguns recursos e aos elevados custos de produção e fabricação. Da mesma forma, segundo Hamza *et al.* (2022), a implantação da biotecnologia LGA para tratamento de águas residuárias ganhou interesse significativo pelo potencial de recuperação de subprodutos como o ALE (do inglês *alginate-like exopolymers*), o Polihidroxialcanoatos (PHA), e o triptofano que são extraídos do EPS dos grânulos, bem como o fósforo que se acumula nos grânulos após a absorção do fosfato em condições aeróbias, e também produção lipídica por consórcio granular algal-bacteriano.

2.5.1 Exopolímero semelhante ao Alginato (ALE)

O alginato é um polissacarídeo e copolímero linear formados por várias proporções de dois monômeros: ácidos β-D-manurônico e α-L-gulurônico (LIN *et al*., 2010). Sua composição pode variar em proporção, comprimento e sequência de blocos dos resíduos de ácidos manurônicos (M) e gulurônicos (G) conforme a natureza da matéria-prima utilizada. Os blocos são compostos por resíduo consecutivos G (GGGGGG), M (MMMMMM) e alternado G e M (GMGMGM) (LEE; MOONEY, 2012).

Devido à sua capacidade de formar géis em contato com cátions divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), o alginato pode ser empregado nas indústrias de alimentos e têxteis como um espessante, como um agente formador de filme para preservação de alimentos e fabricação de papel, como um agente gelificante para encapsulamento de medicamentos e produção de curativos, além de aplicações farmacêuticas e biomédicas avançadas (CAO *et al*., 2020; MORADALI *et al*., 2018).

Atualmente, a produção comercial de alginato advém exclusivamente de algas marinhas marrons tais como *Ascophyllum, Durvillaea, Ecklonia, Laminaria, Lessonia, Macrocystis, Sargassum e Turbinaria* (GAO *et al.*, 2018). Embora ainda não seja comercialmente competitivo, a produção de alginato pelas bactérias do gênero

Pseudomonas aeruginosa, Azotobacter indicus e Azotobacter Vinelandii em condições controladas vêm sendo estudada (HAY et al., 2013; LEE; MOONEY, 2012).

Em LGA, foram observados que os EPS, isto é, uma mistura complexa de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (fosfolipídeos, substâncias húmicas e polímeros intercelulares) que mantêm os microrganismos unidos, apresentava capacidade de formar um gel (SEVIOUR *et al.*, 2009). À vista disso, Yang *et al*., 2014 discorrem que os hidrogéis são elementos chaves para a granulação. Recentemente, esse polímero passou a ser chamado de exopolímero semelhante ao alginato (ALE) já que suas características se assemelhavam às do alginato comercial (LIN *et al.,* 2015). Segundo alguns estudos, o ALE é um biopolímero complexo composto predominantemente por proteínas, polissacarídeos, glucosaminas, glicoconjugados sulfatados, ácidos húmicos e lipídeos (FELZ *et al*., 2020; LIN *et al*., 2015; SCHAMBECK *et al*., 2020).

Felz *et al.* (2016) ao realizarem testes para a formação do hidrogel para produção de ALE de cálcio através de reações entre ALE de sódio e íons de cálcio em solução, observaram a formação de esferas que são comumente chamadas "*beads*". Ainda, segundo o mesmo estudo, cerca de 63% do EPS de grânulos aeróbios que tratam esgoto sanitário doméstico são compostos por ALE, o que pode contribuir para o desenvolvimento da biomassa e otimizar o sistema de tratamento.

Dado que cerca de 15-25% do peso seco dos grânulos aeróbios é composto de ALE, sua recuperação a partir do resíduo excedente de LGA é uma alternativa eficiente e promissora para a produção desse recurso de alto valor agregado (FELZ *et al*., 2016). No Brasil, Rollemberg *et al*. (2020b) e Schambeck *et al.* (2020) avaliaram a presença de ALE em reatores em escala piloto tratando esgoto doméstico, e encontraram taxa de produção de ALE de 10 gALE / KgDQO dia e 9 gALE/KgDQO dia, respectivamente. Algumas pesquisas já demonstraram o potencial de aplicação do ALE nos diversos setores da indústria como material de revestimento de superfície resistente a água (LIN *et al.* 2015), material retardador de chamas para revestimentos (KIM *et al.* 2020), aplicação na agricultura, remoção de fósforo (CHEN *et al.* 2021), dentre outros.

2.5.2 Polihidroxialcanoato (PHA)

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros de origem biológica sintetizados por diversos grupos de bactérias como reserva de carbono e energia. Atualmente, mais de 150 monômeros que podem formar a cadeia principal dos PHAs são conhecidos, os mais comuns o homopolímero poli-3-hidroxibutirato (PHB) e o copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV) diferentes em propriedades químicas e composição (PUYOL *et al*., 2017).

O interesse acerca da recuperação deste bioproduto consiste em suas propriedades mecânicas semelhantes às dos termoplásticos, a sua capacidade de biodegradabilidade e biocompatibilidade (FERNANDEZ-DACOSTA *et al.,* 2015). Assim, os PHAs podem ser usados na produção de embalagens, tintas, fibras, biocombustíveis, camada para contenção de umidade em produtos sanitários (fraldas, absorventes) e na biomedicina.

A produção industrial de PHA baseia-se na atividade de plantas e bactérias, sendo a última alternativa a mais eficiente em questões de custo de produção (KUMAR *et al*., 2020). Entretanto, se comparados com a produção de plástico sintético, o setor encontra dificuldades devido aos elevados custos operacionais, visto que são necessários condições estéreis, substratos puros e métodos de extração e purificação que tornam os PHA's cerca de 3 a 4 vezes mais caros (KOURMENTZA *et al.*, 2017). Segundo Chen *et al.* (2010), desde 1990, empresas como a *Bio-On* (Itália), *Biomer* (Alemanha), *Danimer Scientific* (EUA), *Kaneka* (Japão), *TianAn Biologic* (China) e *PHB Industrial S.A* (Brasil) vem investindo na produção em escala industrial de PHA a partir de cultura microbiana pura.

Em LGA, a síntese de PHA ocorre quando há, no meio, um excesso de matéria orgânica e uma limitação de nutrientes (nitrogênio e fósforo) e oxigênio dissolvido (FERREIRA *et al*., 2021). Assim, alguns microrganismos acumulam carbono na forma de PHA que pode ser usado no crescimento celular e para manter o metabolismo durante o período de fome. Dessa forma, quando o sistema é submetido a uma alimentação anaeróbia (*feast*) seguido por um longo período de fome aeróbio (*famine*), grupos de bactérias que armazenam PHA como os organismos acumuladores de fósforo (PAO's) e os organismos acumuladores de glicogênio (GAO's) são selecionados (ROLLEMBERG *et al.*, 2018). O conteúdo de PHA em LGA pode variar ainda, de acordo os seguintes parâmetros operacionais: taxa de carregamento

orgânico, relação C/N, tamanho do grânulo e taxa de aeração (CARVALHO *et al.,* 2021) e sua produção pode atingir entre 40-70% do peso seco celular dos grânulos (WANG *et al.*, 2017).

2.5.3 Lipídios

Outro subproduto que vem sendo constantemente estudado, mas este como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, é o lipídio. Atualmente, estima-se que as fontes convencionais de energia, como carvão, gás natural e petróleo atendem cerca de 80% da demanda mundial de energia primária (FARIED *et al.,* 2017). Com isso, as frequentes emissões de poluentes, como o dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (NO_2) e metano (CH_4) foram reconhecidas como a causa das mudanças climáticas globais e estão associados a problemas de saúde (KOTCHER, MAIBACH e CHOI, 2019; SHIELDS-MENARD *et al*., 2018).

Diante disso, as fontes de energia renovável, como os biocombustíveis, vêm sendo amplamente estudadas a partir de diferentes biomassas. Recentemente, as microalgas têm sido utilizadas como matéria-prima renovável e sustentável para a produção de bioenergia por apresentarem diversas vantagens, dentre elas, rápido crescimento, maior acúmulo de lipídios e rendimento fotossintético a baixo custo, além de apresentarem excelente eficiência na remoção de poluentes em águas residuárias de ETE's (SARKAR, SINGH e KALITA, 2021). Segundo Azmah *et al*. (2016), as microalgas conseguem acumular carboidratos, proteínas e lipídeos, os quais podem ser convertidos em biocombustíveis como biodiesel, hidrogênio, metano, dentre outros. Esses organismos sintetizam e acumulam uma variedade de moléculas de alta energia, incluindo os ácidos graxos e os triglicerídeos, os principais indicadores de matéria-prima para produção do biodiesel (LEITE *et al*., 2013).

No entanto, apesar da biomassa algal apresentar um alto teor lipídico intracelular, possibilitando a geração de produtos de valor agregado (DU *et al.*, 2019), sua extração se torna onerosa devido à métodos como colheita, adsorção, centrifugação, filtração com membranas, flotação e aprisionamento celular associado à baixa sedimentabilidade e tamanho reduzidos das microalgas, dificultando a separação deste do efluente tratado (TAO *et al*., 2017). Para romper tais limitações, os pesquisadores têm se concentrado nas tecnologias de consolidação de consórcios microalgas-bactérias, que apresentam inúmeras vantagens relacionadas à economia,

energia e meio ambiente, em função das interações simbióticas entre microalgas e bactérias (CHANDRA *et al*., 2019; UMMALYMA *et al.,* 2017).

O teor de lipídios nas microalgas depende basicamente das espécies que predominam no sistema. Sajjadi *et al*., (2018) observaram elevados teores de lipídios em algumas espécies como *Nannochloris sp.* (56%), *Chorella sp.* (58%) e *Neochloris oleabundans* (65%). Fotogrânulos cultivados em FRBS, por exemplo, são frequentemente dominados pelas microalgas *Chorella sp*, exibindo grande potencial para produção lipídica nesse sistema.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados durante todo período experimental.

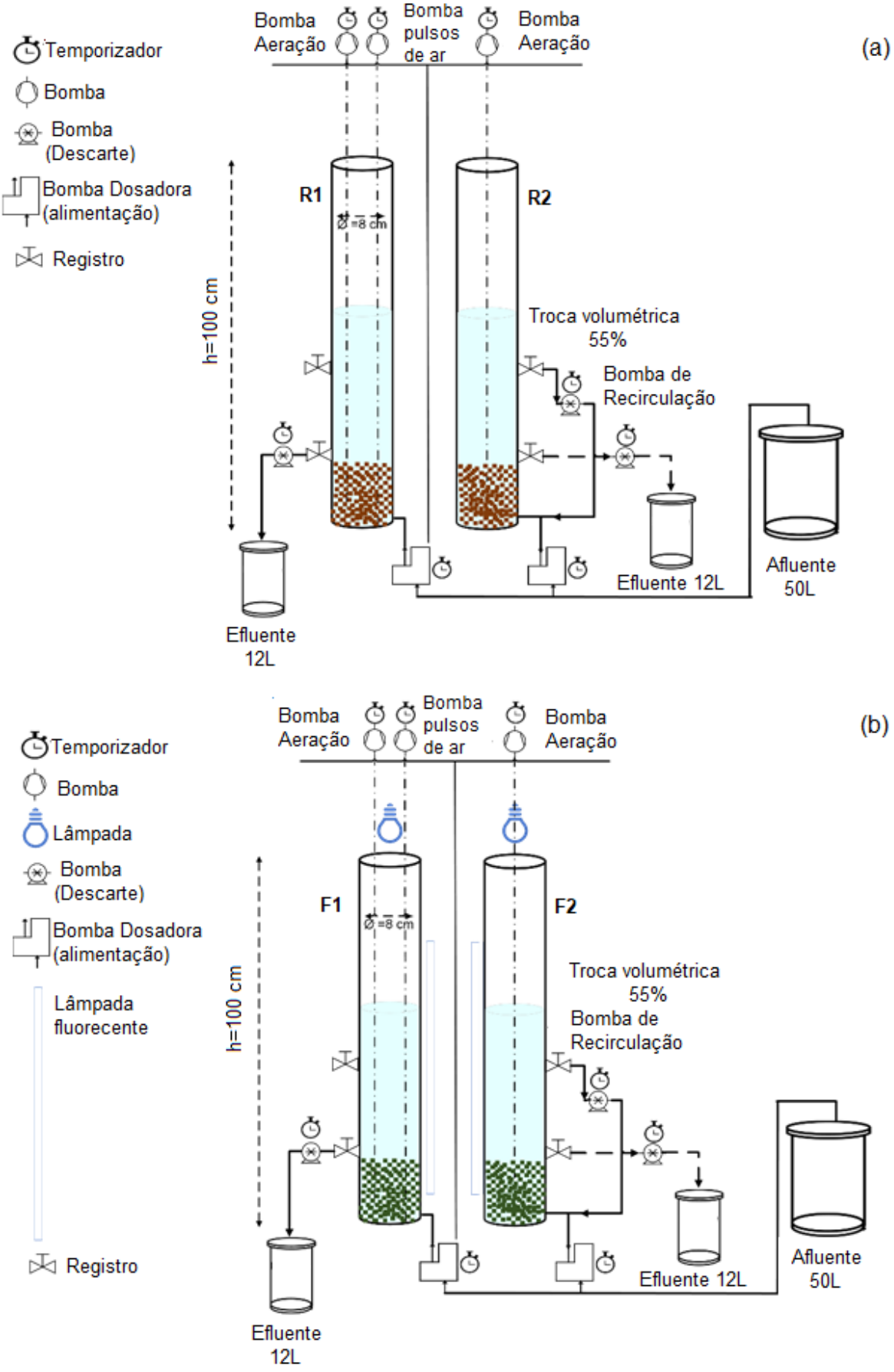
3.1 SISTEMA EXPERIMENTAL

O sistema experimental foi conduzido no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA), localizado no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE na cidade de Recife, com duração de 70 dias.

Para condução do experimento foram utilizados quatro reatores em bateladas sequenciais em escada de bancada, sendo dois reatores com biomassa bacteriana (R1 e R2) e dois fotobiorreatores com consórcio microalga-bacteriano (F1 e F2). Os reatores foram confeccionados em acrílico transparente com as seguintes dimensões: 74 mm de diâmetro, 3 mm de espessura da parede, 1 m de altura total com um volume de 5,0 L e volume útil de 2,2 L. A troca volumétrica foi de 55%. O esquema dos reatores é apresentado na Figura 5.

Os fotobiorreatores (F1 e F2) foram submetidos à iluminação artificial (lâmpada fluorescente) com intensidade luminosa de 140 ± 20 μmol/m^2.s sob condição de fotoperíodo de 12h (luz ligada) e 12h (luz desligada). As lâmpadas foram fixadas a 10 cm da parede lateral do reator e em sua porção superior, a fim de cobrir toda a área do sistema em estudo. A intensidade luminosa foi medida por meio de luxímetro Akrom Kr852 **(**Akrom Produtos Eletrônicos, São Leopoldo-RS). A condição adotada de iluminação foi baseada nos resultados encontrados por Lee *et al*. (2015), que obteve melhores resultados para remoção de matéria orgânica e nutrientes ao aplicarem ciclo de 12:12 horas (escuro:claro) em relação a outras condições 36:12h e 60:12h. Os reatores foram montados dentro de câmaras protegidos da luz externa.

Figura 5 - Layout do esquema operacional dos reatores bacterianos (a) e consórcio (b)



Fonte: Adaptado de MARINHO (2020).

O sistema operacional era composto por recipientes de armazenamento de afluente e efluente, reator em escala de bancada, temporizadores, bombas de alimentação, bombas de aeração, bombas de pulsos de ar, bombas de recirculação e bombas de descarte. O ciclo operacional iniciava-se com a alimentação dos reatores utilizando uma bomba dosadora (HANNA®, modelo BL Black Stone) no qual proporcionava esgoto doméstico sintético contendo 280,8 ± 53,6 $mg.L^{-1}$ de matéria orgânica. A alimentação foi do tipo lenta (30 min) e ascendente proporcionando o contato com a biomassa ao entrar no sistema. As bombas de aeração e de pulsos de ar (Boyu SC-7500) forneciam oxigênio aos reatores. A difusão de ar foi realizada por meio de pedras porosas redondas (ø=3 cm), evitando o acúmulo da biomassa na base do reator. A recirculação do sobrenadante nos reatores R2 e F2 foi realizada por meio de bomba hiperestática (Watson Marlow 503S) e o descarte do efluente era feito por eletrobomba de drenagem (CONSUL). O esgoto sintético foi mantido refrigerado a 8 ± 2°C, e todo o sistema foi automatizado por temporizadores.

3.1.1 Inóculo microbiano e efluente sintético

Os quatro reatores foram inoculados com 1,0 L de lodo aeróbio (6,2 gSST/L) oriundo da estação de tratamento de esgoto ETE-SEAL em Cabo de Santo Agostinho que integra a região metropolitana de Recife-PE. A biomassa apresentou característica floculenta e concentração de Sólidos suspensos voláteis do licor misto (SSVLM) de 4600 mg/L e Índice volumétrico de lodo de 30 minutos (IVL_{30}) de 238 mL/g. Nenhum pré-tratamento foi aplicado ao lodo antes da inoculação dos reatores em estudo, assim como também não houve o cultivo de microalgas para fins de inoculação nos FRBS. As microalgas foram induzidas a crescerem naturalmente sob efeito de estratégia da iluminação artificial.

O esgoto doméstico sintético (Afluente A) foi utilizado para a alimentação dos reatores cujas concentrações orgânicas e componentes micro e macro nutricionais foram semelhantes aos de esgoto doméstico real. O esgoto doméstico sintético foi formulado no laboratório utilizando reagentes com elevado grau de pureza e composição conhecida. No 58° dia de operação a ureia do esgoto doméstico sintético foi substituído por cloreto de amônio e denominou-se de afluente B. Os reagentes utilizados na composição do esgoto doméstico sintético estão descritos na Tabela 1 e Tabela 2.

Tabela 1 - Composição do afluente sintético

COMPOSTO	FÓRMULA MOLECULAR	CONCENTRAÇÃO		UNIDADE
		Afluente A	Afluente B	
Fonte de Carbono				
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	39,8	39,8	mg/L
Amido	$C_6H_{10}O_5$	96,0	96,0	mg/L
Extrato de Carne	-	162,4	162,4	mg/L
Peptona	-	24,3	24,3	mg/L
Ácido acético	CH_3COOH	12,0	12,0	mL/L
Ácido Propiônico	$C_3H_6O_2$	3,5	3,5	mL/L
Macronutrientes				
Cloreto de amônio	NH_4Cl	0,0	143,0	mg/L
Ureia	CH_4N_2O	61,3	0,0	mg/L
Fosfato monopotássico	KH_2PO_4	26,4	26,4	mg/L
Cloreto de Cálcio	$CaCl_2$	18,5	18,5	mg/L
Sulfato de magnésio heptahidratado	$MgSO_4.7H_2O$	34,3	34,3	mg/L
Solução de micronutrientes	-	1,0	1,0	mL/L

Fonte: A autora (2021).

Tabela 2 - Solução de micronutrientes

COMPONENTE	FÓRMULA MOLECULAR	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
Ácido bórico	H_3BO_3	50,0
Cloreto de zinco	$ZnCl_2$	50,0
Cloreto de Cobre	$CuCl_2$	38,0
Sulfato de manganês monohidratado	$MnSO_4.H_2O$	50,0
Molibidato de amônio tetrahidratado	$(NH_4)6MO_7O_{24}.4H_2O$	50,0
Cloreto de alumínio	$AlCl_3$	50,0
Cloreto de cobalto hexahidratado	$CoCl_2.6H_2O$	63,5
Cloreto de níquel	$NiCl_2$	50,0

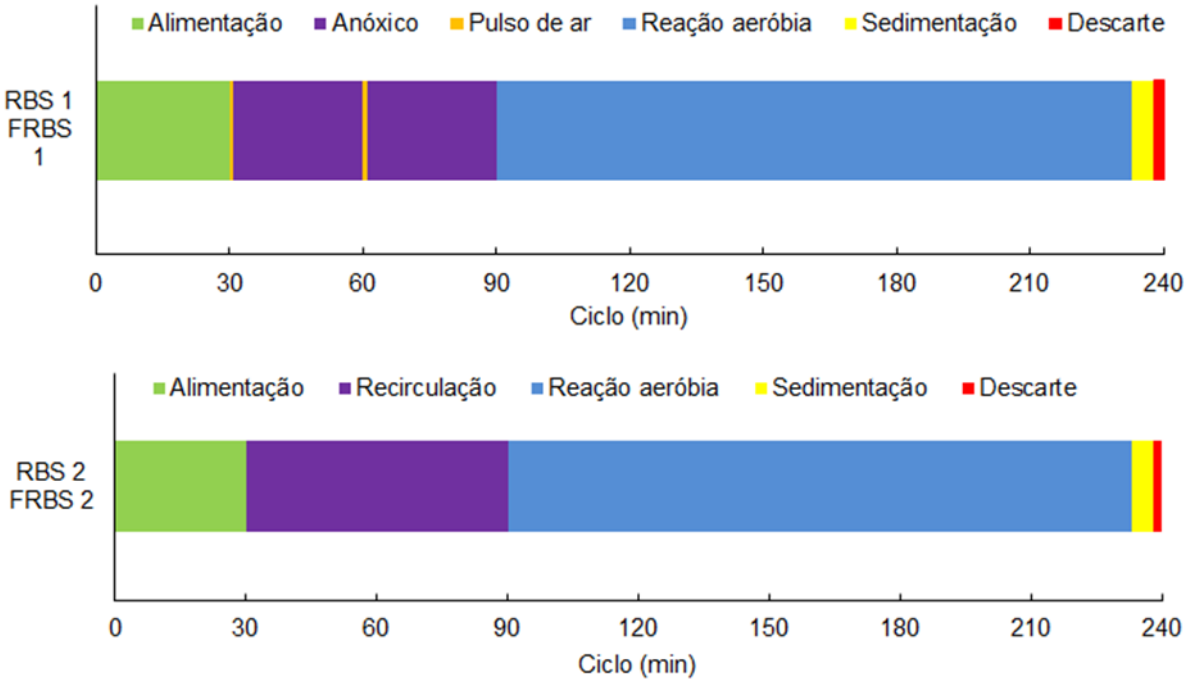
Fonte: HUANG *et al*. (2015).

3.2 ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS

Os reatores foram operados em bateladas sequenciais com ciclos de 4 horas, totalizando 6 ciclos diários. Para atingir os objetivos da pesquisa, duas estratégias operacionais foram aplicadas aos reatores. O modo de operação dos reatores R1 e F1 consistiu em alimentação não aerada (30 min), fase anóxica (60 min) com pulsos de ar de 1 min a cada 30 min, fase aeróbia (143 min), sedimentação (5 min) e descarte (2 min).

Os reatores R2 e F2 consistiam em alimentação não aerada (30 min), recirculação do esgoto sobrenadante (60 min), fase aeróbia (143 min), sedimentação (5 min) e descarte (2 min), conforme demonstrado na Figura 6. Todo o experimento foi realizado em temperatura ambiente (26 ± 1ºC), o oxigênio dissolvido na aeração não foi controlado e permaneceu entre 6 a 8 mg/L.

Figura 6 - Estratégia operacional aplicado



Fonte: A autora (2021).

A diferença operacional entre os reatores R1 e R2 residiu na fase anóxica/anaeróbia, apresentando no reator R1 a estratégia de pulsos de ar em intervalos regulares de 30 minutos com duração de 1 minuto, totalizando dois pulsos por ciclo, e no R2 foi introduzido o sistema de recirculação do esgoto sobrenadante

com duração de 1 hora. Ambas as estratégias tinham como objetivo promover o contato da biomassa com o substrato. Ressalta-se que os pulsos de ar não aumentaram significativamente a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no reator, sendo mantidas, portanto, condições anóxicas e anaeróbias durante o ciclo. Os reatores F1 e F2 são idênticos em questões operacionais, aos R1 e R2 respectivamente.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO MONITORAMENTO DOS REATORES

Nessa seção será apresentada os processos metodológicos utilizados para análise do monitoramento dos reatores como analises físico-químicas, IVL, analise granulométrica, clorofila-a e microscopia.

3.3.1 Análises físico-químicas

Para avaliar os fatores relacionados à recuperação de subprodutos foram realizadas análises físico-químicas conforme metodologias propostas pelo *Standard Methods for the Examination of Waterand Wastewater 21th Ed* (Tabela 3). As análises foram efetuadas semanalmente.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos monitorados

Parâmetro	Método de análise	Referência
OD, T e pH	Sonda Multi-parâmetro	Multiparâmetro Hach HQ40d
DQO total e solúvel	Colorimétrico	APHA, 2012
Nitrito ($N\text{-}NO_2^-$)	Colorimétrico/ Cromatográfico	EPA, 2003
Nitrato ($N\text{-}NO_3^-$)	Colorimétrico/ Cromatográfico	EPA, 2003
Nitrogênio Amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$)	Destilação/ Titulométrico	APHA, 2012
Fósforo total e ortofostato	Colorimétrico/Cromatográfico	APHA, 2012; EPA, 2003
Série de sólidos	Gravimétrico	APHA, 2012

OD – Oxigênio Dissolvido (mg/L), T – Temperatura (°C), pH – Potencial Hidrogênionico

Fonte: A autora (2022).

3.3.2 Índice Volumétrico do Lodo e microscopia

O índice volumétrico do lodo (IVL) foi determinado segundo metodologia proposta por Schwarzenbeck *et al*. (2004), baseado no método padrão de IVL_{30}. Esse método propõe que a análise determine o IVL para diferentes tempos, entre eles 5, 10 e 30 minutos. Para isso, a determinação do IVL foi realizada a partir de 1000 mL do licor misto e determinados os índices para 5, 10 e 30 minutos de sedimentação da biomassa conforme Equação (**1**. A análise de IVL em R1 e R2 para 10 min e 30 min está demostrado na Figura 7.

$$IVL_t = \frac{VL_S \times 1000}{SST} \quad (1)$$

Onde:

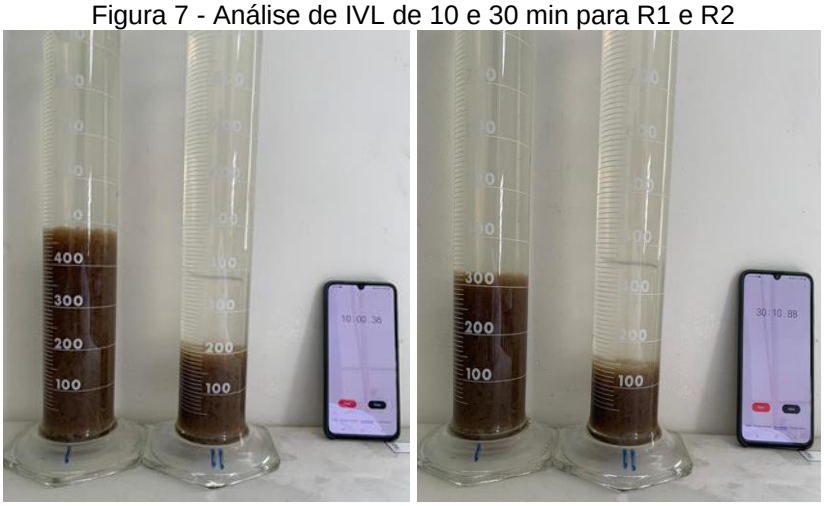
IVL_t = o índice volumétrico de lodo sedimentado no tempo t;

VL_s = volume de lodo sedimentado por volume total inicial (mL/L);

SST = concentração de sólidos suspensos totais do licor misto;

t = tempo de sedimentação (min)

Figura 7 - Análise de IVL de 10 e 30 min para R1 e R2



Fonte: A autora (2021).

As análises microscópicas foram obtidas por meio de imagens com ampliação de 100x e 400x do licor misto pela câmera BEL view 7.1 photonics acoplada ao

microscópio óptico (marca Leica®, modelo MDE) e através da câmera do celular XIAOMI Redmi 7 no mesmo microscópio.

3.3.3 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada por meio de peneiramento segundo metodologia adaptada de Bin *et al*. (2011). Para tal, uma amostra de 100 mL do licor misto foi tomada de cada reator. Um conjunto de peneiras em aço inoxidável com aberturas de malhas de 0,2, 0,4, 0,6 e 1,0 mm foram empilhadas na ordem crescente do MESH das peneiras. Um recipiente abaixo da última peneira coletava a biomassa com diâmetro menor que 0,2 mm.

A biomassa retida em cada peneira foi recuperada por retrolavagem com água deionizada e reservada em béqueres. Em seguida, as amostras correspondentes a cada ordem granulométrica ($ø < 0,2$ mm, $0,2$ mm $< ø < 0,4$ mm, $0,4$ mm $< ø < 0,6$ mm, $ø > 0,6$ mm) foram filtradas para determinação dos sólidos suspensos totais (SST) segundo metodologia do *Standard Methods for the Examination of Waterand Wastewater* (APHA, 2012). Para determinação da distribuição granulométrica foi calculado o percentual do peso que cada fração corresponde em relação ao valor de SST.

3.3.4 Análise de Clorofila-a

A clorofila-a é uma medida utilizada para determinar a presença de microalgas no sistema, independentemente se a simbiose foi bem-sucedida ou não. Essa análise foi realizada conforme metodologia descrita por Tang *et al*. (2016), em que amostras de 20 mL de licor misto tomadas dos reatores F1 e F2, foram acondicionadas em tubo de fundo cônico de 50 mL e centrifugado a 4000 rpm por 10 min. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 20 mL de acetona 90% e 0,05 g de $CaCO_3$. Agitou-se a amostra no vórtex durante 1 min.

A suspensão obtida foi armazenada a 4°C por 24 horas no escuro e centrifugada a 4000 rpm por 10 min, e então o sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de Clorofila-a no meio. Após estas etapas, realizou-se a leitura da absorbância da amostra em quatro comprimentos de onda: 750 nm, 663 nm, 645 nm e 630 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (NANOCOLOR® VIS

II). A solução de acetona a 90% foi utilizada como branco. O cálculo efetuado para quantificar a clorofila-a está demonstrado na Equação (**2**.

$$Chl-a = \frac{[(11{,}64\times(OD_{633}-OD_{703})-2{,}6\times(OD_{645}-OD_{750})+0{,}1\times(OD_{630}-OD_{750})]V_1}{V.\sigma} \quad (2)$$

Onde:

Chl-a é a concentração de clorofila-a em mg/L;

V = volume em litros da amostra coletada;

V_1= volume em mL de acetona 90% usada para extração;

OD_{630} = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 630nm;

OD_{663} = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 663nm;

OD_{645} = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 645nm;

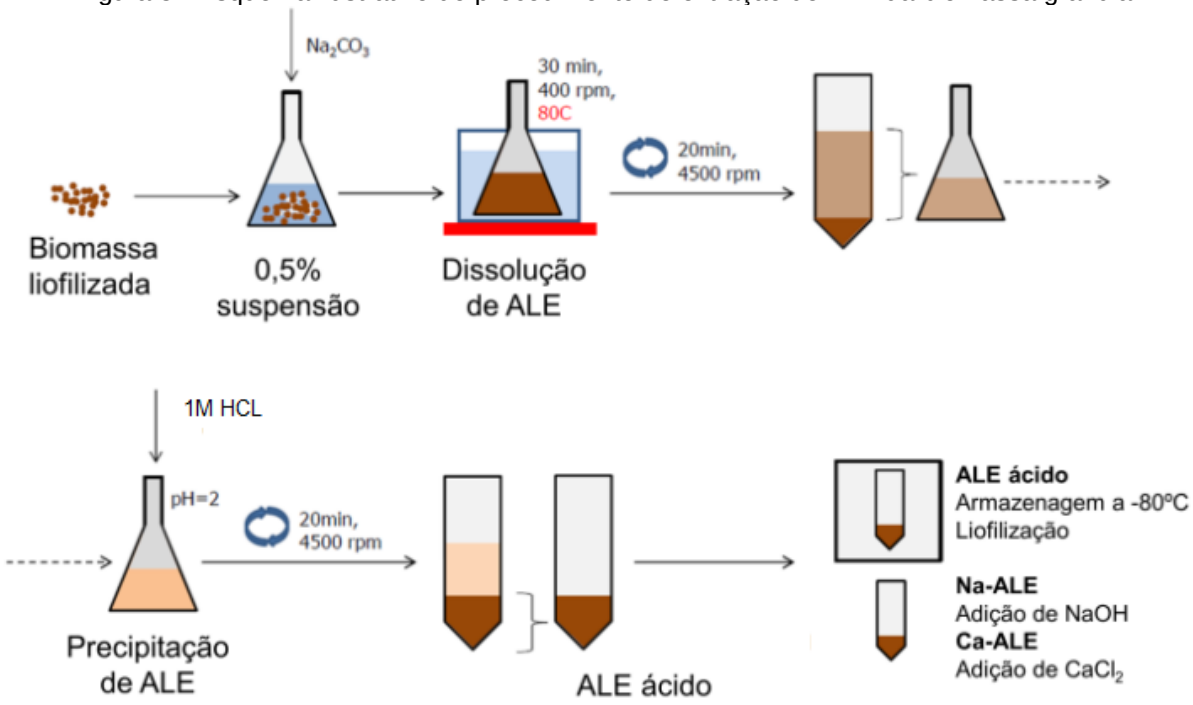
OD_{750} = leitura da densidade óptica no comprimento de onda 750nm;

σ= é o caminho óptico da cubeta (cm).

3.4 EXOPOLÍMERO SEMELHANTE AO ALGINATO (ALE)

O potencial de recuperação de ALE foi avaliado seguindo a metodologia descrita por Felz *et al.* (2016), Guimarães (2017) e Schambeck *et al.* (2020), demonstrada na Figura 8. As frações em massa de extratos ácidos de ALE produzidos na biomassa granular foram extraídas a partir de cerca de 3 g de licor misto centrifugado. O lodo sedimentado no *pellet* foi transferido para um erlenmeyer com 50 mL de água ultrapura, 0,25 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e agitador magnético. O erlenmeyer foi submetido a banho-maria (80ºC) e foi agitado a 400 rpm por 35 min. Em seguida, o licor misto foi centrifugado para recuperar o sobrenadante. Extraiu-se o ALE a partir do EPS, com adição de 1 M de ácido clorídrico (HCl) (SCHAMBECK *et al*., 2020), e quantificado por medição de sólidos voláteis, de acordo com Felz *et al*. (2016).

Figura 8 - Esquema ilustrativo do procedimento de extração de ALE da biomassa granular



Fonte: Guimarães (2017).

3.5 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

O PHB foi determinado por despolimerização ácida do PHB (KARR; WATERS e EMERICH, 1983). A análise dosa o ácido crotônico produzido pela catálise ácida com H_2SO_4, em um intervalo de 0,01 a 14 µg de PHB.

Inicialmente, pesou-se a massa com valores entre 5 e 10 mg de biomassa liofilizada que foi transferida para tubos de vidro de 10 mL com tampa de rosca. Essa massa foi suspensa em 2 mL de H_2SO_4 concentrado e colocado em banho-maria a 98°C, por 30 min. A amostra foi colocada em banho de gelo e depois diluída em proporção de 1:10 (solução obtida a partir da biomassa:H_2SO_4 5 mM).

A solução obtida foi filtrada em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm e, armazenadas um volume superior a 500 µL em tubos de vidros tampados e devidamente identificados.

Para a leitura das amostras foi utilizado cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) da Marca Shimadzu, modelo LC20AT, configurado com sistema de bombas quaternárias, degaseificador da fase móvel, sistema de injeção de amostras automático, compartimento termostatizado para a coluna analítica Aminex HPX-87H, detector de arranjo de diodos (DAD) e índice de refração (RID). As amostras foram

diluídas com H2SO4 5mM (modo isocrático) e a leitura foi feita a 210 mm (fluxo = 1,0 mL/ min) à temperatura de forno de 40 °C. O volume de injeção utilizado foi 10 µl.

3.6 LIPÍDIOS

A quantificação da produção lipídica da biomassa do consórcio microalgal-bacteriano foi realizada conforme metodologia descrita por Indarti *et al*. (2005). Essa metodologia consiste em duas etapas principais: determinação da biomassa algal seca e extração do óleo total da biomassa.

Inicialmente, pesou-se uma cápsula de porcelana com uma membrana de fibra de vidro (Ø =1,2 µm) previamente lavada com 50 mL de água deionizada e seca a 550 °C e anotou-se o P1. Em seguida, filtrou-se 50 mL do licor misto na membrana de fibra de vidro e, o conjunto de porcelana e membrana com a biomassa foi seca à 105°C, pesou-se o P2.

Para a extração de lipídios, colocou-se a membrana com a amostra seca em cartucho de celulose e acoplou ao sistema soxhlet. Foi utilizado solução de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), ou seja, foi adicionado 100 mL de clorofórmio e 50 mL de metanol em balão de 250 mL e acoplados ao sistema para extração. O conjunto foi aquecido por chapas de aquecimento por 8 horas a 80°C. O esquema da extração é mostrado na Figura 9. O solvente dos balões foi evaporado por aquecimento, sobrando apenas os lipídios, que foi pesado (P3). Após lavar o balão e secar, pesou-se a massa do balão (P4). O cálculo do teor de lipídios está descrito na Equação (3.

$$Teor\ de\ lipídios\ (\%) = \frac{P_3 - P_4}{P_2 - P_1} \quad (3)$$

Onde:

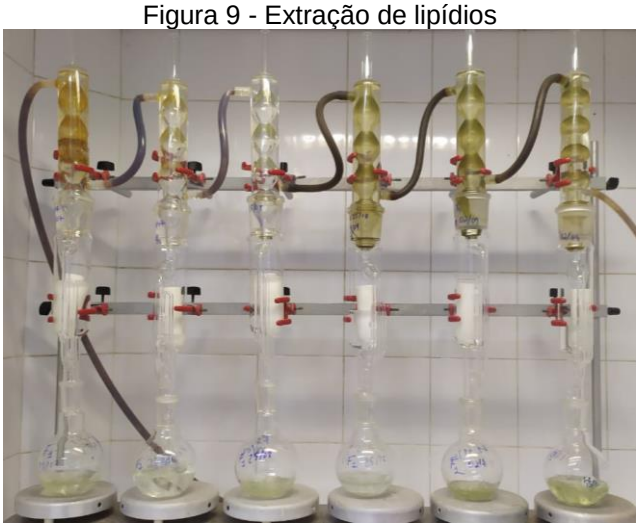
P_1 = massa da cápsula com membrana de vidro seca a 550 °C;

P_2 = massa da cápsula com membrana e biomassa seca a 105 °;

P_3 = massa do conjunto balão de 250 mL e lipídeos extraído.

P_4 = massa do balão de 250 mL;

Figura 9 - Extração de lipídios



Fonte: A autora (2021).

3.7 BIOLOGIA MOLECULAR

Para caracterização da comunidade microbiana em R1 e R2, foram empregadas técnicas de biologia molecular consistindo em extração de DNA e sequenciamento genético em metabarcoding do gene 16S do RNA *ribossomal*.

Para isso, inicialmente foram extraídos o DNA a partir de amostras do licor misto. As amostras foram armazenadas em tubo de fundo conico de 50mL a temperatura de -20°C. Para a extração do DNA foi utilizado o kit Power Soil® (MoBio *Laboratories* Inc., EUA), conforme instruções do fabricante. Após a extração, foram realizadas as leituras das concentrações e da pureza do DNA (relação 260/280 nm) no espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Espectrophotometer Thermo Scientific®).

Para o sequenciamento, foram utilizadas amostras do inóculo$_1$ (dia 1), R1 (dia 29 e 64) e R2 (dia 29 e 64) que correspondeu aos períodos de granulação parcial (dia 29) e falha (dia 64) do sistema. As amostras foram encaminhadas para o laboratório Neoprospecta Microbiome Technologies (Florianópolis-SC), onde foi realizado o sequenciamento massivo das regiões V3/V4 do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA) utilizando o equipamento Miseq Sequencing System (Illumina Inc., USA). Os *primers* utilizados para a ampliação foram 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT). As identificações taxonômicas foram realizadas utilizando o banco Silva.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentadas as análises e discussões dos resultados obtidos neste estudo.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO AFLUENTE SINTÉTICO

As características do afluente sintético utilizado neste estudo em termos de pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura (T), matéria orgânica (DQO total), nitrogênio total e amoniacal, fósforo total e ortofosfato estão descritas na Tabela 4. Esse afluente é caracterizado de acordo com Metcalf e Eddy (2015) como de baixa concentração visto que possui concentrações de matéria orgânica abaixo de 339,0 mg/L. Na literatura, a formação de grânulos em escala piloto foram obtidos com sucesso quando utilizados afluente de baixa concentração (325,1±134,9 mg/L), conforme demonstrado por Alves (2017). Em escala de bancada, Marinho (2020) obteve granulação completa com 40 dias de operação ao utilizar afluente sintético com características intermediárias e de baixa concentração (±400,0 mg/L) no desenvolvimento de fotogrânulos aeróbios (0,2<Ø<1,0mm).

Tabela 4 - Características do esgoto doméstico sintético

Parâmetros	**Valor médio**
Oxigênio dissolvido (mg/L)	0,8 ± 0,4
pH	6,9 ± 0,3
Temperatura (°C)	23,5 ± 1,1
DQO (mg/L)	280,8 ± 53,6
Nitrogênio total (mg/L)	47,6 ± 15,2
Nitrogênio amoniacal (mgNH_{4+}/L)	5,2 ± 2,8
Fósforo total (mg/L)	3,3 ± 1,0
Ortofosfato (mg/L)	2,8 ± 0,3

Fonte: A autora (2021).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA E ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Essa seção trará os resultados e discussões das características físicas e biológicas da biomassa granular e fotogranular desenvolvidos nos RBS e FRBS durante o experimento.

4.2.1 Formação de grânulos aeróbios

A seguir serão apresentados os resultados e discussões relacionadas a formação dos grânulos aeróbios nos reatores R1 e R2 quanto a concentração de sólidos, IVL, distribuição granulométrica, desenvolvimento granular e população microbiana.

4.2.1.1 Sólidos e IVL

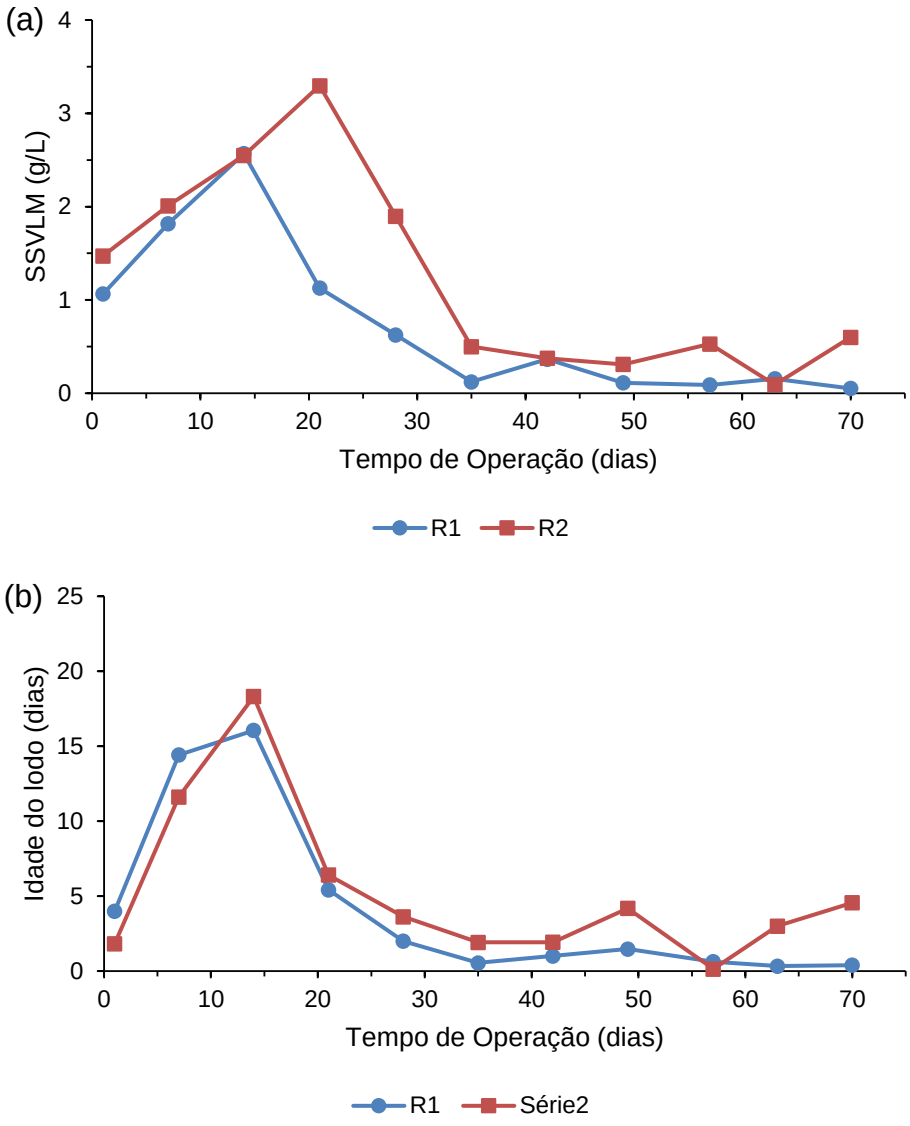
A concentração inicial de SSVLM em R1 e R2 deve-se aos sólidos presentes no inóculo. Diante disso, no início da operação, a concentração de biomassa em ambos os reatores foi de cerca de 1,0 g/L (Dia 0). Logo, adotou-se como estratégia de formação da biomassa o ciclo operacional com tempo de sedimentação de 20 minutos durante três semanas. Desse modo, é possível observar o aumento gradativo da biomassa nesse período, conforme ilustrado na Figura 10. Concentrações máximas de SSV nos reatores foram obtidas no 14° dia para o R1 e 21 dias para o R2 atingindo 2,6 g/L e 3,3 g/L, respectivamente.

Por outro lado, após esse período, foi observada a diminuição gradativa da biomassa no sistema, atingindo valores, em ambos os reatores, abaixo de 0,5 g/L no 35° dia de operação. Dois fatores podem ter contribuído para essa situação. O primeiro está relacionado a perda da biomassa ao diminuir o tempo de sedimentação para 10 min utilizado como estratégia operacional para melhorar a capacidade de sedimentação da biomassa. Akaboci (2013) também relatou perda do lodo em cerca de 70% durante a diminuição do tempo de sedimentação para 10 min. Em concordância, Rosmam *et al*. (2013) observaram a diminuição da concentração da biomassa no sistema de 5,3 gSSV/L para 2,2 gSSV/L, indicando lavagem da biomassa no reator.

Além disso, outro fator que pode ter contribuído para essa condição, foi o desenvolvimento do nematoide *Aeolosoma Hemprichi* (Figura 14 e Figura 15) em ambos os reatores, observado no 23° dia com auxílio de um microscópio de luz branca. O *Aelosoma Hemprichi* é um verme anelídeo que pode promover a redução de lodo, apresenta cerca de 1,2 mm de tamanho e tempo de duplicação médio de 1,4 dias, sendo considerado um predador de flocos (SONG e CHEN, 2009; LIANG *et al*., 2006). Com isso, notou-se uma redução brusca na concentração de SSVLM do reator

quando o tempo de sedimentação foi reduzido de 10 minutos para 5 minutos para eliminar o nematóide do reator, o que ocasionou a diminuição na idade do lodo (Figura 10b). A fim de reduzir a perda da biomassa no sistema, o tempo de sedimentação foi aumentado para 10 min, permanecendo até o final da operação.

Figura 10 - Concentração de SSVLM (a) e idade do lodo (b) em R1 e R2



Fonte: A autora (2021).

A capacidade de sedimentação da biomassa foi avaliada em termos de IVL_{10} e IVL_{30} (Tabela 5). A queda acentuada nos valores de IVL nos dias iniciais indicou que o modo de operação melhorou as características de sedimentabilidade do lodo. Pode-se notar que no R1 houve uma queda gradual do IVL_{30} de 300,8 para 58,4 mL/g (Tabela 5), sendo observada em outros estudos de granulação, como Mourão *et al.* (2021), e representando a evolução de lodo floculento para lodo granular. No entanto,

a partir do 22° dia operacional observou-se um aumento em seu valor até se tornar indetectável. Em R2, também foi observado uma redução gradual nos valores de IVL_{30} de 163,0 para 30,3 mL/g no 35° dia. Estudos relatam que faixas de IVL_{30} entre 30 e 80 mL/g podem indicar excelente capacidade de sedimentação dos grânulos (DERLON *et al*. 2016; MOURÃO *et al*. 2021).

Tabela 5 - Concentrações de IVL_{10}, IVL_{30} e IVL_{30}/IVL_{10} em R1 e R2

Tempo (dias)	R1			R2		
	IVL_{10} (mL/g)	IVL_{30} (mL/g)	IVL_{30}/IVL_{10} (%)	IVL_{10} (mL/g)	IVL_{30} (mL/g)	IVL_{30}/IVL_{10} (%)
1	507,5	300,8	59,3	244,6	163,0	66,7
9	121,1	82,6	68,2	119,4	84,6	70,8
15	74,0	58,4	78,9	86,3	62,8	72,7
22	141,8	119,7	84,4	39,4	30,3	76,9
36	-	-	-	200,0	160,0	80,0
50	-	-	-	159,6	-	-
64	535,7	-	-	548,4	322,6	58,8

Fonte: A autora (2021).

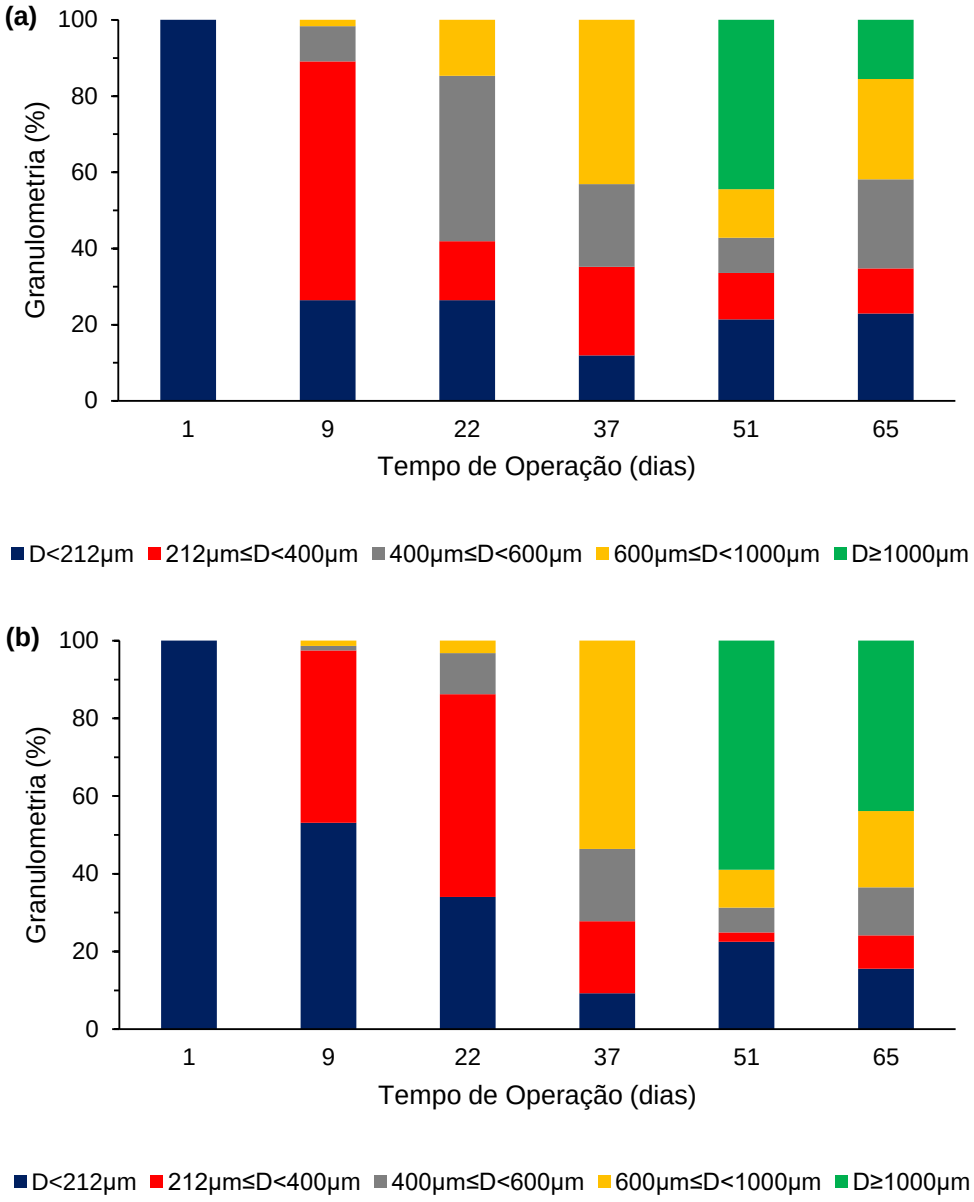
Sob outra perspectiva, segundo De Kreuk *et al*. (2005), assume-se que o processo de granulação é atingido de forma completa dado que a relação IVL_{30}/IVL_{10} é próxima a 90%. Apesar disso, a análise da microscopia indicou a presença de grânulos apenas após 22° dia, observados na Figura 12 e Figura 13. Diante disso, admite-se que a granulação parcial ocorreu em ambos os reatores após 22° dia e se manteve até o 36 dia de operação.

Após 36° dia operacional, os valores de IVL em R1 tornaram-se indetectáveis. Esse fenômeno pode estar associado a fragmentação granular e o desenvolvimento de bactérias filamentosas (Figura 12). Geng *et al.* (2021) também observaram a deterioração das propriedades de sedimentação do lodo e lavagem da biomassa do sistema decorrente do crescimento de organismos filamentosos.

4.2.1.2 Distribuição granulométrica da biomassa

Segundo De Kreuk *et al*. (2005), ainda que a biomassa seja considerada granular quando pelo menos 50% dos sólidos presentes no reator possuem diâmetro superior a 0,2 mm, o processo de granulação completa só é atingido quando essa porcentagem atinge 80%. Esse critério foi alcançado durante as primeiras semanas de operação (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição granulométrica da biomassa dos reatores R1(a) e R2(b)



Fonte: A autora (2021).

No dia 9, houve predominância de 73,6% de lodo com diâmetro superior a 0,2 mm no R1 e apenas 46,9% no R2 (Figura 11). Apesar de indicar que a biomassa é majoritariamente granular no R1, a relação IVL_{30}/IVL_{10}, no mesmo período, ainda era inferior a 0,9 para ambos os reatores. Além disso, como mencionado anteriormente, não havia indícios de grânulos na microscopia nos primeiros dias de operação. O aumento do diâmetro dos grânulos ocorreu gradualmente, e no 22º dia operacional, a presença da biomassa granular se estabeleceu no sistema promovida pela agregação bacteriana. Biomassa com características granulares já eram 88,0% e 90,8%, respectivamente para R1 e R2, no 37º dia operacional. Esses resultados corroboram

com Rollemberg *et al*. (2020) que ao avaliarem a formação granular em escala piloto, tratando águas residuárias de baixa concentração e clima tropical alcançaram granulação completa após 35 dias de operação, indicando que as condições operacionais e clima favorecem a rápida granulação em curto período de tempo.

Apesar da grande fração da biomassa apresentarem nos 51° e 65° dias de operação, diâmetros superiores a 0,6 mm, os valores de IVL foram indetectáveis e a concentração de sólidos eram baixas, menor que 0,5 mgSSV/L. Nesse período, a biomassa apresentava característica floculenta e filamentosa como pode ser observada na Figura 12 e Figura 13. Layer *et al.* (2019) também observaram a presença de biomassa flocular (20-40%) no sistema LGA no 40° dia que se manteve até o final do experimento. A presença de flocos em sistema LGA está associado a exposição dos grânulos (biomassa) a substratos orgânicos com alto teor de partículas que são parcialmente hidrolisados na fase anaeróbia (de Kreuk *et al*., 2010). Assim, a fração não hidrolisada é degradada em condições aeróbias promovendo o favorecimento de organismos heterotróficos comuns e crescimento filamentoso (Pronk *et al*., 2015).

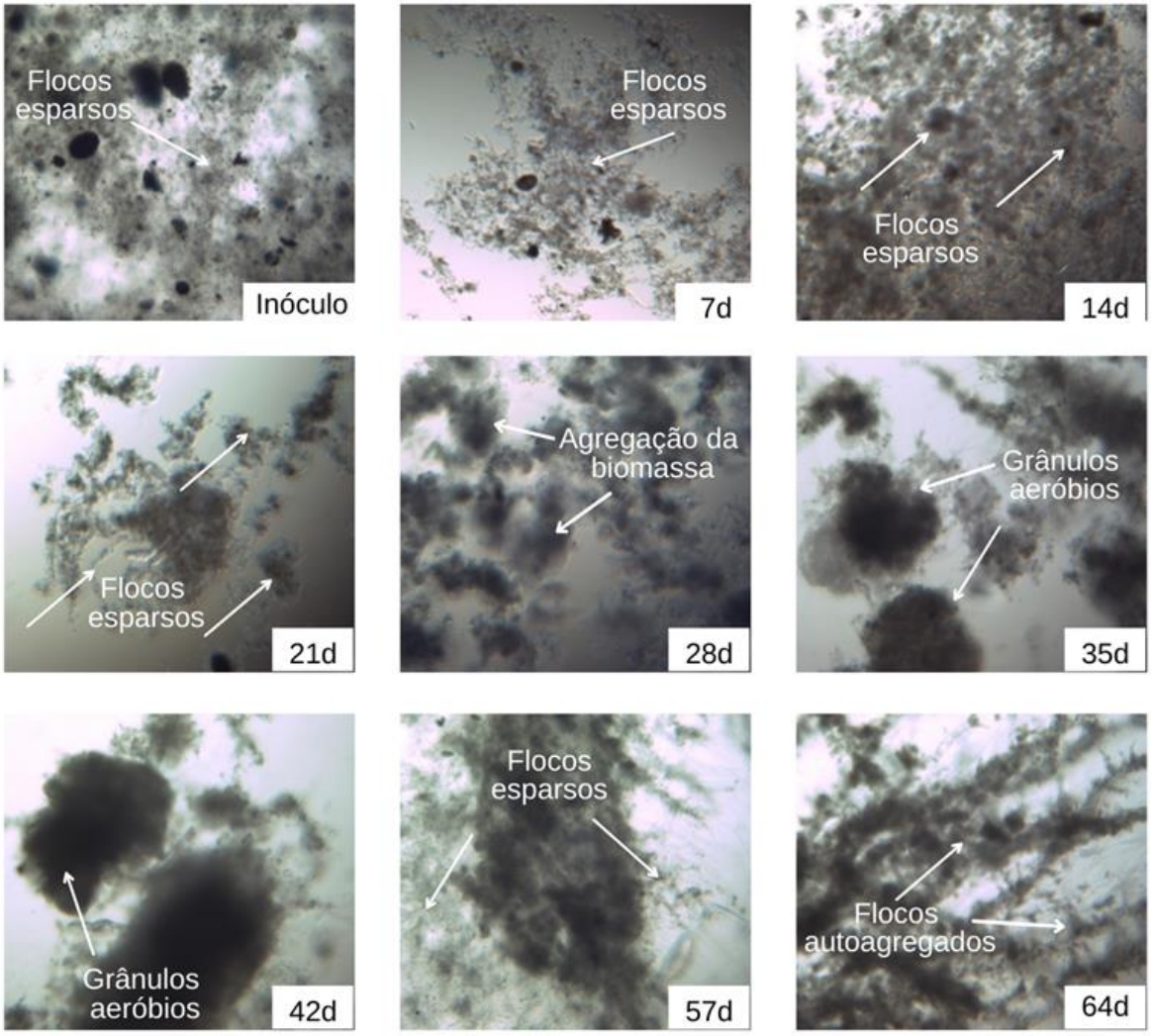
4.2.1.3 Desenvolvimento da biomassa

A dinâmica de agregação microbiana e a morfologia dos grânulos em R1 e R2 ao longo do experimento foram acompanhadas por microscopia, e podem ser vistas na Figura 12 e Figura 13. Até o 21° dia de operação, a biomassa se apresentava predominantemente floculenta para os ambos os reatores, com a presença de flocos esparsos (indicado por setas). Após o 28° dia operacional, tanto para R1 quanto no R2 foram observadas a agregação da biomassa e formação de pequenos grânulos (0,4mm). Assim como neste estudo, Dantas (2018) relatou a presença de agregados granulares e poucas bactérias filamentosas ao operarem RBS-LGA em escala piloto no 30° dia de operação.

No 35° dia operacional houve predominância de grânulos aeróbios e poucas bactérias filamentosas e floculentas em ambos os reatores. No entanto, no 42° dia foi observado o desenvolvimento de bactérias filamentosas em torno da biomassa granular no R2 (Figura 13). Shambeck *et al*. (2020) discorreram que durante a fase de aclimatação do lodo, caracterizada por nenhuma ou baixa fração de grânulos (dia 0 a dia 182), o lodo foi dominado por biomassa flocular e heterogênea em RBS. Segundo

Liu *et al*. (2021) quando o sistema LGA foi alimentado com efluente sintético simples, as partículas de lodo apresentaram partículas emaranhadas ou ligadas por filamentos, pouco definidas.

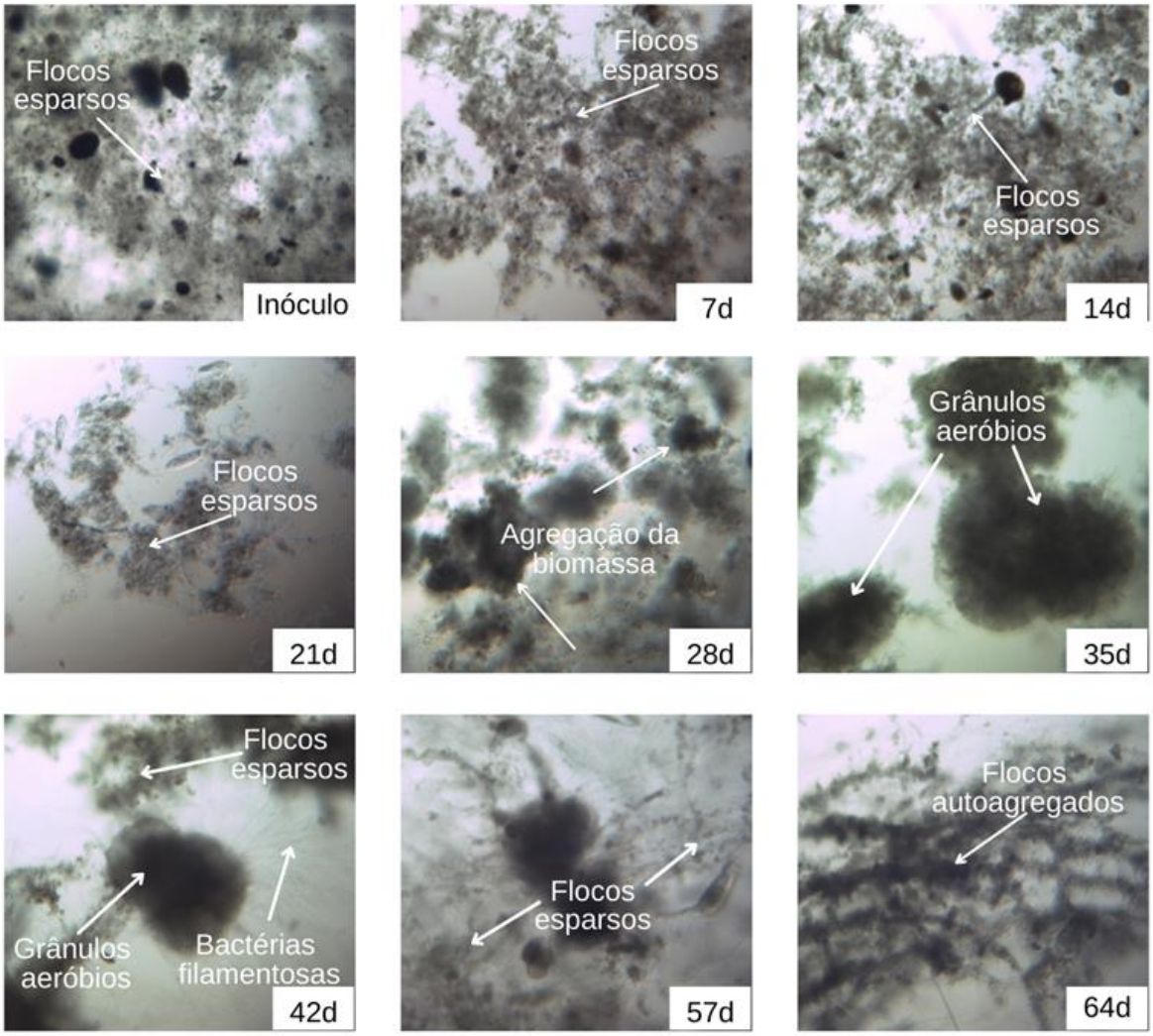
Figura 12 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x



Fonte: A autora (2021).

No entanto, a partir do 49° dia, a morfologia dos grânulos mudou para uma estrutura mais fibrilosa decorrente da agregação de bactérias aos filamentos. Nesse período, apesar da análise granulométrica indicar a presença de grânulos grandes (>1cm), nota-se pela microscopia que havia a presença de grandes flocos de autoagregados sem formato regular.

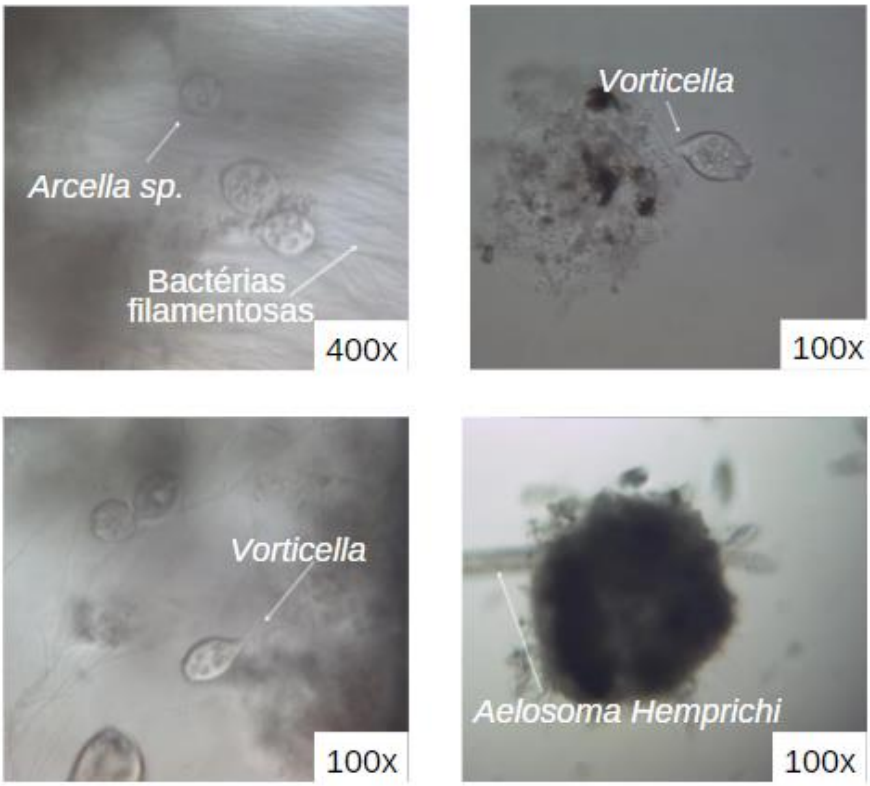
Figura 13 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do R2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x



Fonte: A autora (2021).

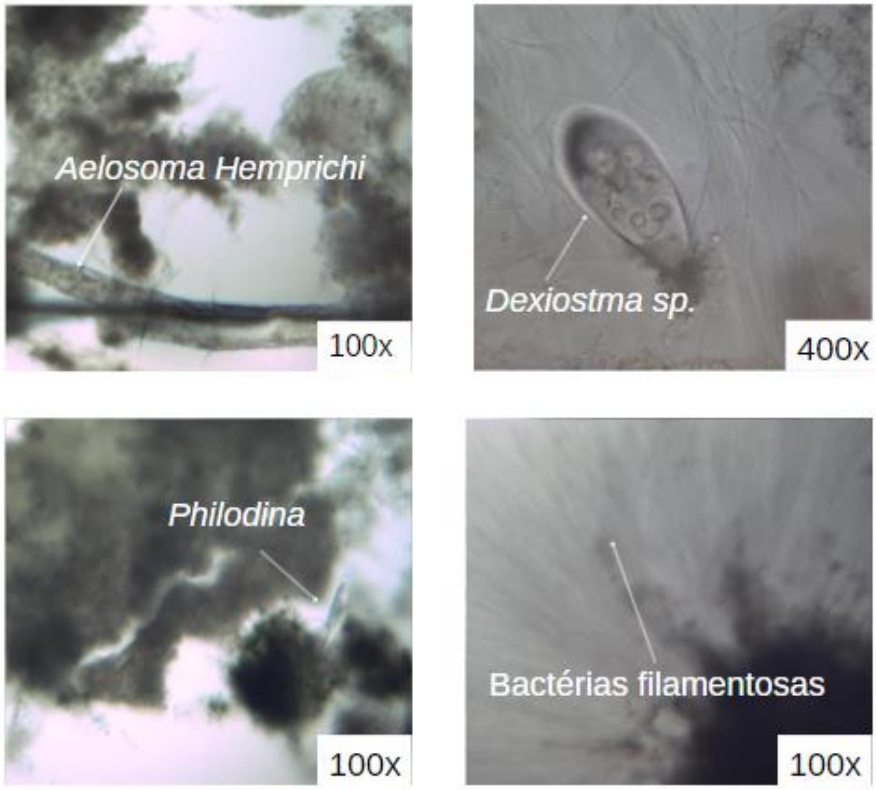
Durante a operação do sistema observou-se, em ambos os reatores, a presença de diversos grupos de microrganismos como protozoários, metazoários e nematoides comumente encontrados em lodo ativado (Figura 14 e Figura 15). A presença de *Arcella*, *Vorticella e Philodina* indicaram um sistema bem oxigenado. Por outro lado, com o decorrer do experimento a presença do nematóides do tipo *Aeolosoma hemprichi* ocorreu possivelmente devido à alta concentração de OD e/ou excesso de lodo. A seção 4.6 trará a discussão da comunidade microbiológica presente nestes sistemas.

Figura 14 - Microrganismos identificados utilizando microscopia óptica em R1.



Fonte: A autora (2021).

Figura 15 - Microrganismos identificados utilizando microscopia óptica em R2.



Fonte: A autora (2021).

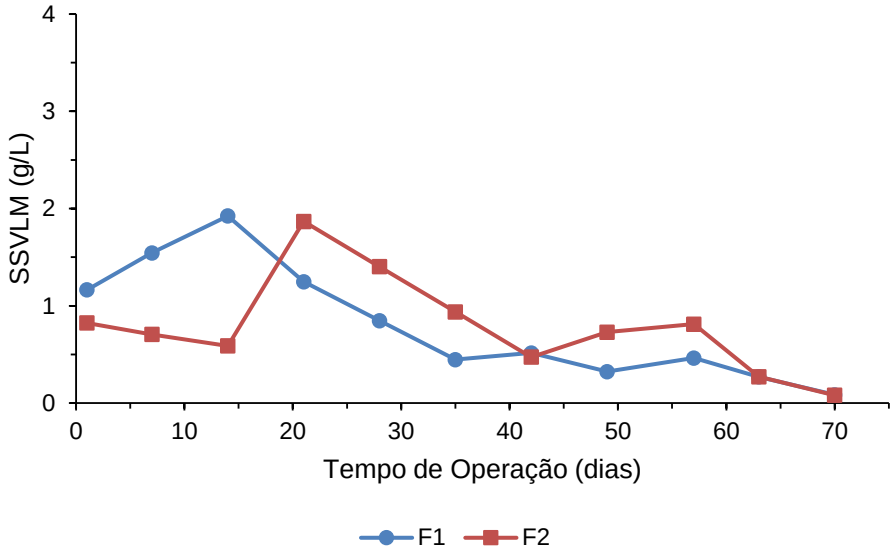
4.2.2 Formação de Fotogrânulos

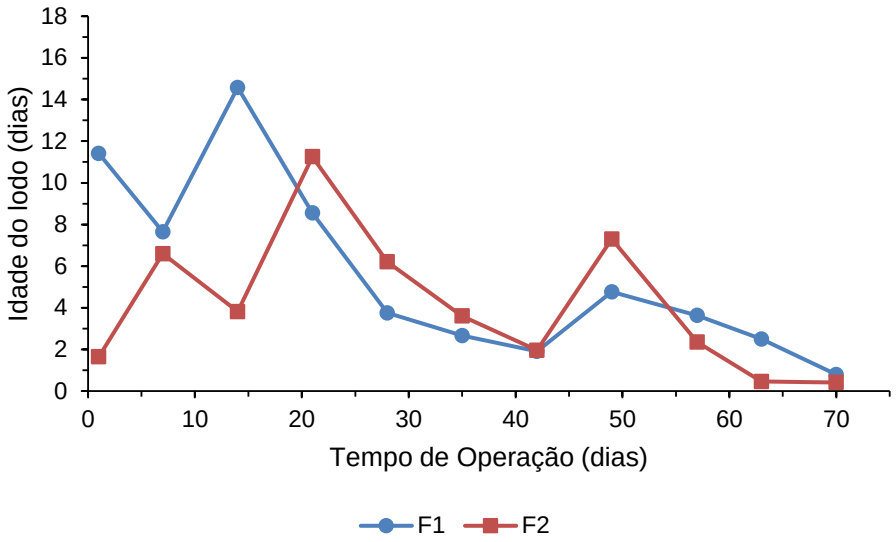
A seguir serão apresentados os resultados e discussões relacionadas a formação dos fotogrânulos aeróbios nos reatores F1 e F2 com relação a concentração de sólidos, IVL, distribuição granulométrica, desenvolvimento granular, população microbiana e clorofila-a.

4.2.2.1 Sólidos e IVL

A Figura 16 apresenta a concentração de SSVLM ao longo do experimento. Assim como em R1 e R2, a concentração inicial (dia 0) de 1,0 g/L de SSVLM em F1 e F2 deve-se aos sólidos presentes no inóculo. É importante salientar que o inóculo utilizado foi o mesmo utilizado nos reatores bacterianos, e sem adição de microalgas. A estratégia operacional para formação da biomassa seguiu a mesma aplicada em R1 e R2 com relação ao tempo de sedimentação.

Figura 16 - Concentração de SSVLM em F1 e F2





Fonte: A autora (2021).

Até o 14° dia operacional, os reatores F1 e F2 se comportaram de formas diferentes, enquanto no F1 houve aumento gradativo da biomassa atingindo 2,0 g/L de concentração de SSV, no F2 houve perda gradativa de 1 g/L para 0,6 g/L, aproximadamente (Figura 16).

No 21° dia operacional, o F2 atingiu a concentração máxima de SSV de 1,9 g/L, enquanto o F1 perdeu biomassa, chegando a concentrações mínimas de 0,4 g/L no 35° dia de operação. Após o 57° dia, as concentrações de biomassa em ambos os fotobiorreatores decresceram até 0,1 g/L, aproximadamente.

Essa perda de biomassa esteve frequentemente associada ao surgimento de microrganismos *Aeolosoma hemprichi* como mencionados anteriormente e à desintegração da biomassa. Alves (2017) discorre que o surgimento do nematoide *Aeolosoma hemprichi* ocasionou perda significativa da biomassa em cerca de 77% ao utilizar estratégia de redução do tempo de sedimentação de 10 para 8 minutos a fim de eliminar esse microrganismo do sistema, resultando na menor concentração de sólidos no reator de aproximadamente 0,2 g/L.

Em termos de IVL (Tabela 6), tem-se que o inóculo, composto por biomassa floculenta, apresentava baixa sedimentabilidade (IVL_{30} = 260 mL/g). Por isso, ambos os fotobiorreatores (F1 e F2) foram submetidos a tempos de sedimentação de 20 min com o intuito de selecionar a biomassa mais densa e descartar flocos de menores tamanhos, assim como realizado Marinho (2020) que ao utilizar essa estratégia para um tempo de sedimentação curto (3 min) obteve grânulos com excelente capacidade de sedimentação (IVL_{30} = 40 mL/g) após 40° dia de operação.

Tabela 6 - Concentrações de IVL_{10}, IVL_{30} e IVL_{30}/IVL_{10} em F1 e F2

Tempo (dias)	F1			F2		
	IVL_{10} (mL/g)	IVL_{30} (mL/g)	IVL_{30}/IVL_{10} (%)	IVL_{10} (mL/g)	IVL_{30} (mL/g)	IVL_{30}/IVL_{10} (%)
1	412,4	274,9	66,7	230,6	169,9	73,7
9	155,4	116,6	75,0	170,0	134,6	79,2
15	62,4	59,8	95,8	76,5	68,0	88,9
22	128,2	112,2	87,5	80,3	74,9	93,3
36	267,9	245,5	91,7	138,6	127,9	92,3
50	-	-	-	181,4	126,6	69,8
64	-	-	-	-	-	-

Fonte: A autora (2021).

Assim, ainda nos dias iniciais, nota-se a diminuição gradativa dos valores de IVL_{30} decorrentes da agregação microbiana em ambos os fotobiorreatores. Diante disso, excelente capacidade de sedimentação foi obtida no 15° dia, alcançando aproximadamente 59,8 mL/g e 68,0 mL/g para F1 e F2, respectivamente. Esses resultados corroboraram com Zhang *et al.* (2018) que ao avaliarem a granulação em fotobiorreatores de consórcio algal-bacteriano em condições fototróficas (ciclos claro-escuro de 12h/12h) alcançaram IVL30 <50 mL/g.

Apesar da relação IVL_{30}/IVL_{10} está próximo a 0,9 (90%), indicando processo de granulação completa (De Kreuk *et al*., 2005), os valores de IVL_{30} aumentaram consideravelmente. Esse fenômeno também foi observado por Marinho (2020) indicando sinal de desintegração granular.

4.2.2.2 Distribuição granulométrica da biomassa

Para compreendermos essa situação, a Figura 17 apresenta a distribuição granulométrica em porcentagem da biomassa nos fotobiorreatores F1 e F2.

Como mencionados anteriormente, ambos os reatores foram inoculados com lodo ativado. Assim, o inóculo apresentava biomassa floculenta com partículas de diâmetro inferior a 0,2 mm (dia 0). Admite-se que o reator possui predominância granular quando este atingir 50% das partículas com diâmetros superiores a 0,2 mm, já a granulação completa é constituída quando este possuir 80% das partículas com diâmetros superiores a 0,2 mm (de Kreuk *et al*., 2005). Diante disso, pode-se observar no F1 que após 9° dia de operação, houve o início a granulação parcial e no 22° dia, constatou-se predominância granular.

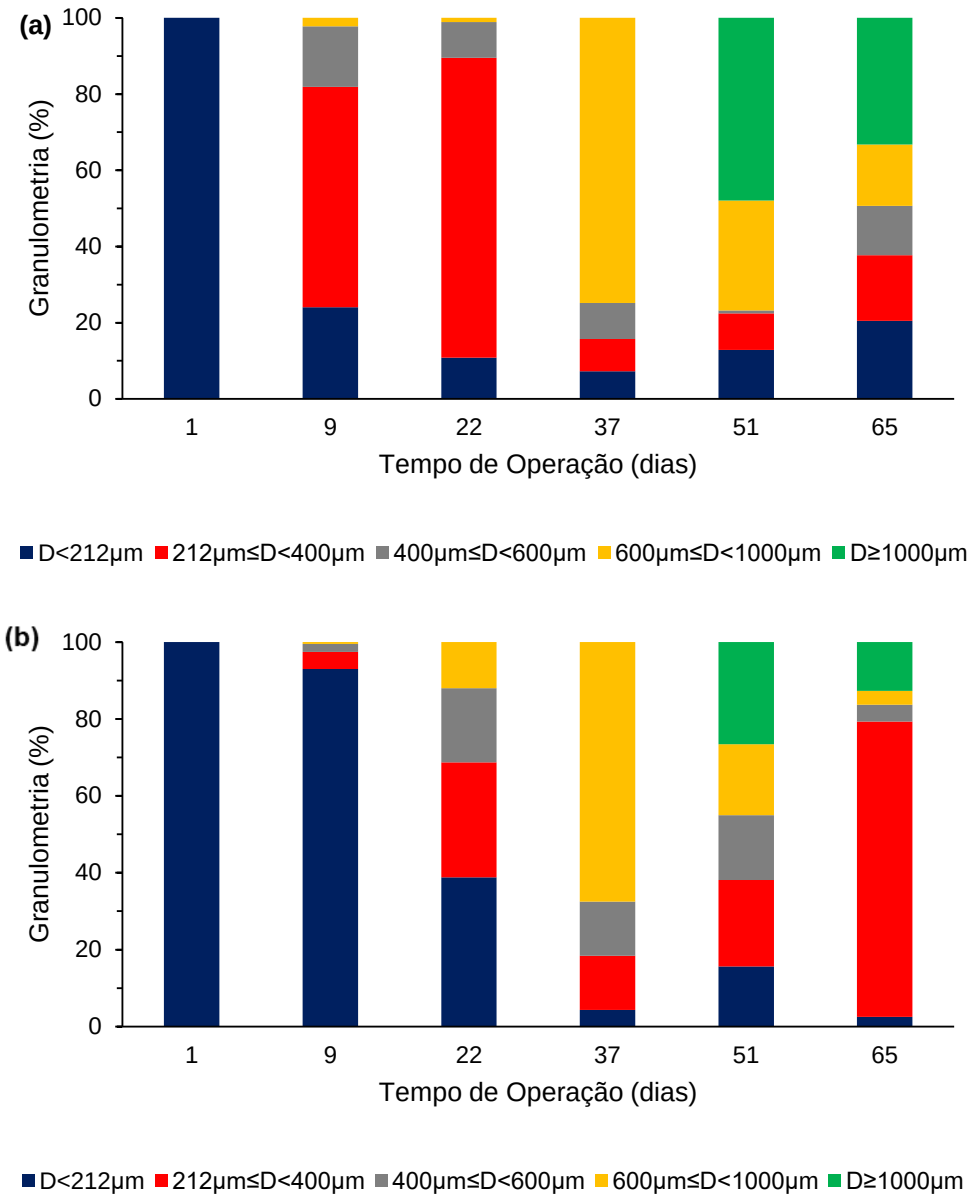
No 37° dia, cerca de 75% da biomassa granular possuía diâmetro entre 0,6 mm e 1 cm, corroborando com estudo desenvolvido por Cai *et al.* (2019) que ao operarem

FRBS tratando esgoto doméstico de baixa carga orgânica, observaram o desenvolvimento de fotogrânulos de pequena dimensão, com diâmetro médio de 0,61 mm.

Por outro lado, quando a recirculação foi usada, o desenvolvimento de grânulos seguiu a passos lentos. No 9° dia de operação, havia predominância de partículas com diâmetros inferiores a 0,2 mm e apenas no 22° dia de operação houve o início a granulação parcial. Apenas no 37° dia foi observado granulação completa com cerca de 95% de grânulos com diâmetros superiores a 0,2 mm. Desse modo, a granulação completa foi obtida com 22 dias de operação para o experimento de pulsos de ar (F1) e 35 dias para o fotobiorreator com recirculação do sobrenadante (F2), com grânulos variando de 0,2 a 0,6 mm de diâmetros.

A rápida granulação pode estar associada a fase de alimentação lenta anaeróbia/anóxica de 30 minutos corroborando com Zhang *et al*., (2018) que observaram rápida granulação em FRBS devido à aderência das microalgas na superfície granular.

Figura 17 - Distribuição granulométrica da biomassa dos reatores F1(a) e F2(b)



Fonte: A autora (2021).

Após o 37° dia, apesar da análise granulométrica apresentar resultados superiores a 0,6 mm, e muitos acima de 1 cm, foi evidenciada a presença de alguns agregados densos que não tinham formato arredondado, que pode ter dado falso resultado.

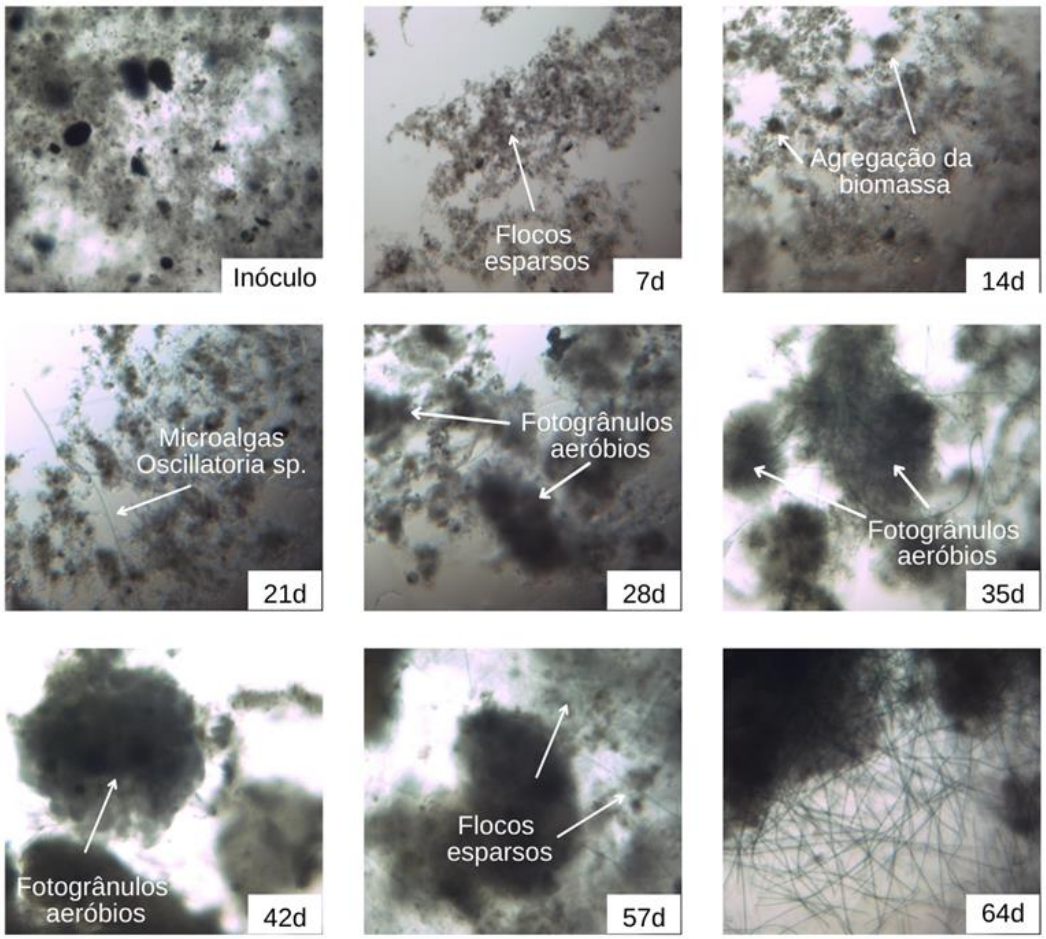
4.2.2.3 Desenvolvimento da biomassa e população microbiana

A evolução da formação dos fotogrânulos em F1 e F2 ao longo do período de operação pode ser visualizada na Figura 18 e Figura 19. O lodo utilizado como inóculo

era formado majoritariamente por flocos, os quais apresentavam estrutura morfológica irregular.

No F1 (Figura 18), após 7 dias de operação, a biomassa era floculenta e dispersa. Já no 14° dia, observou-se o início da aglomeração dos microrganismos para a formação dos grânulos. E, no 21° dia foi possível observar o surgimento das primeiras microalgas como a *Oscillatoria sp*. A partir do 21° dia, os grânulos se tornaram mais densos, apresentando estrutura regular e esférica. Entretanto, no 57° dia foi observado a formação de flocos no sistema.

Figura 18 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do F1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x



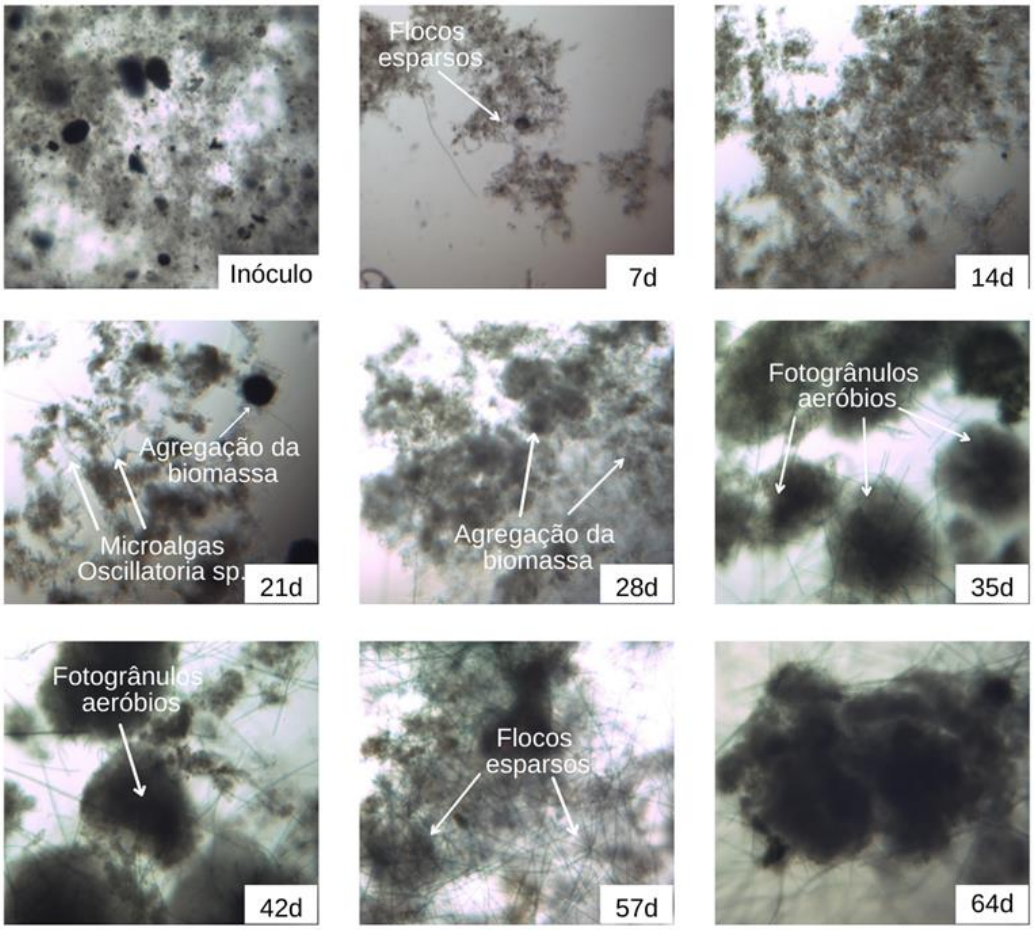
Fonte: A autora (2021).

No F2 (Figura 19), a formação fotogranular ocorreu de forma mais lenta quando comparados com F1. No 7° dia de operação, a biomassa encontrava-se com características floculentas e dispersas no sistema, não havendo sinal de agregação da biomassa. Essas características se estenderam até o 21° dia, no qual foi possível

visualizar o surgimento das primeiras microalgas e o início da aglutinação dos microrganismos.

Apesar disso, no 28° dia de operação, ainda não havia a formação de grânulos, que veio a ocorrer apenas no 35° dia. Grânulos estáveis e densos foram observados a partir do 35° dia e se estenderam até 57 dias de operacional. A partir do 57° dia de operação, biomassa apresentou características floculenta decorrente da recuperação da biomassa oriunda do ciclo anterior, devido a problemas operacionais junto ao sistema de recirculação do fotobiorreator. Entretanto, no 64° dia, o sistema já apresentava formação granular, com pouca biomassa (Figura 16).

Figura 19 - Acompanhamento do desenvolvimento da biomassa do F2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 100x



Fonte: A autora (2021).

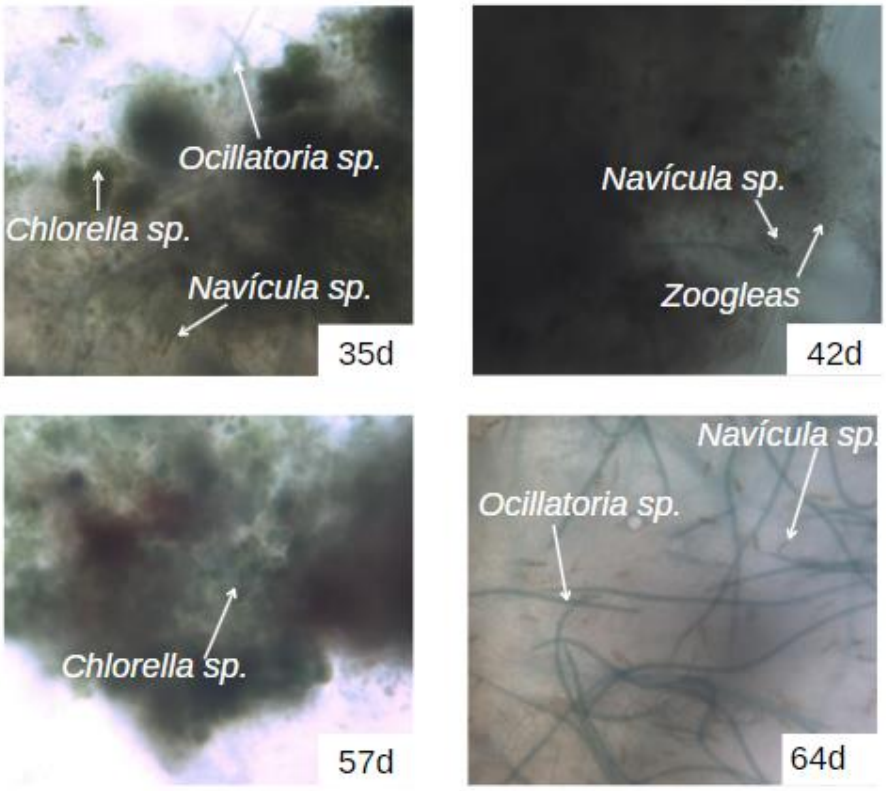
A microscopia óptica também foi utilizada para identificar os microrganismos presentes no licor misto dos reatores. Essa análise é de suma importância para a obtenção de informações sobre o funcionamento do sistema e seu processo depurativo, assim como para a identificação das fases de estabilização da biomassa

(Cybis e Pinto, 1997). Desse modo, imagens de microscopia com ampliação de 400x evidenciaram o surgimento de microalgas ao longo do experimento, as quais, são demonstradas nas Figura 20 e Figura 21.

O surgimento das primeiras microalgas foi observado a partir do 21° dia de operação nos reatores F1 e F2. A partir do 35° dia até o final do experimento (dia 70), observou-se o favorecimento de diatomáceas como a *Navícula sp.* e *Chlorella sp,* provavelmente decorrente do acúmulo de nitrito, evidenciado no sistema, uma vez que, conforme discorre Zhang *et al.*, (2018), acúmulo de nitrito pode favorecer esse tipo de diatomáceas. A concentração média de nitrito no efluente durante todo o experimento foi de cerca de 5,2 mg/L para F1 e 3,4 mg/L para F2.

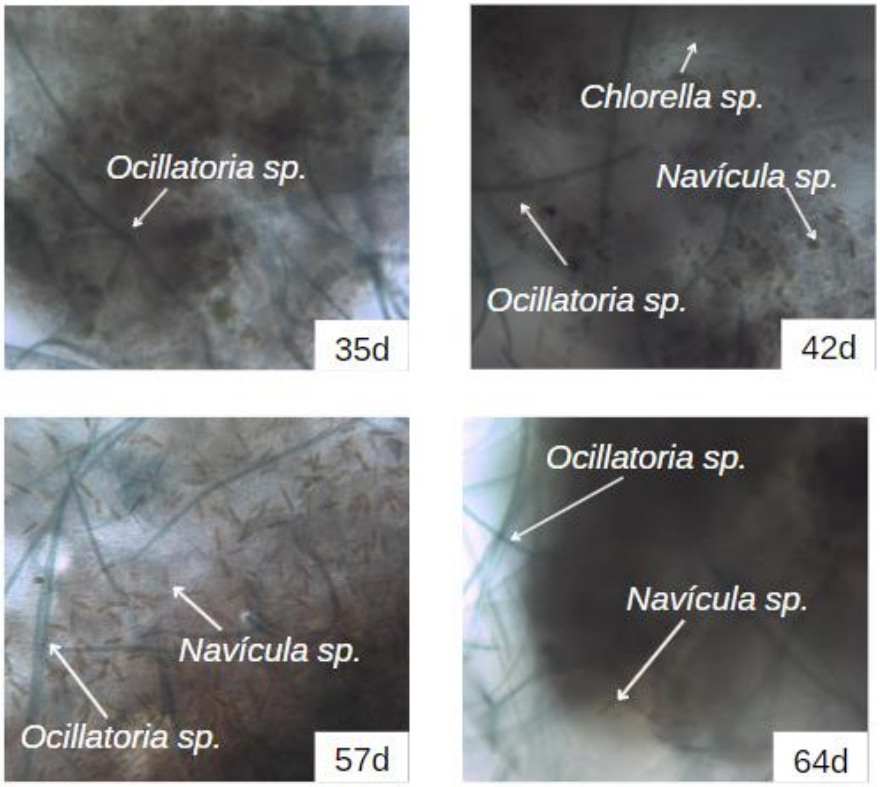
As cianobactérias (*Oscillatoria sp*.) estiveram presentes no sistema em ambos os reatores a partir do 21° dia e se mantiveram até o final do experimento. A predominância desta microalga conferiu estabilidade granular, influenciando no aumento do tamanho dos agregados. Segundo Abouhend *et al.* (2018), o desenvolvimento de cianobactérias no sistema promove o desenvolvimento de grânulos mais estáveis e menos suscetíveis a desintegração, como evidenciado neste estudo.

Figura 20 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no F1 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x.



Fonte: A autora (2022).

Figura 21 - Acompanhamento do aparecimento de microalgas no F2 utilizando microscopia óptica com ampliação de 400x.



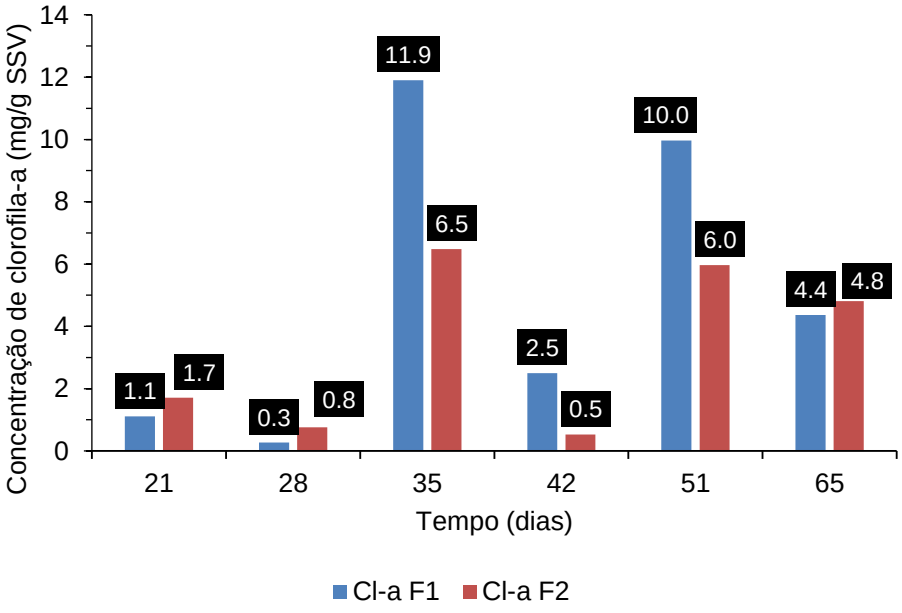
Fonte: A autora (2021).

4.2.2.4 Clorofila-a

A concentração de clorofila-a foi monitorada durante toda a operação do sistema de modo a avaliar o desenvolvimento do consórcio granular algal-bacteriano (Figura 22). No 21° dia de operação foi possível observar a presença de microalgas em ambos os reatores (Cla-a = 1,1 e 1,7 mg/gSSV para F1 e F2, respectivamente).

Valores máximos de clorofila-a foram obtidas apenas no 35° dia de experimento coincidindo com o período granular do sistema, alcançando 11,9 mg/gSSV para o F1 e 6,5 mg/gSSV para F2 indicando acúmulo de microalgas no sistema ou fotogranulação (He *et al*., 2018). Os conteúdos de clorofila-a médios ao longo do experimento em termos de biomassa corresponderam a 5,0 mg/gSSV para o sistema com pulsos de ar (F1) e 3,4 mg/gSSV para recirculação (F2).

Figura 22 - Variação das concentrações de clorofila-a durante operação



Fonte: A autora (2021).

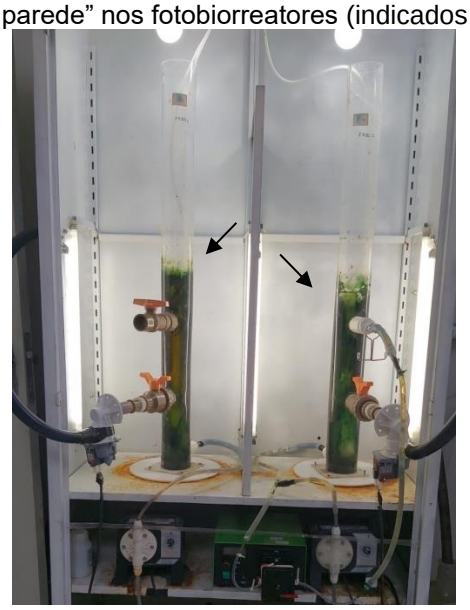
A diminuição da concentração de clorofila-a no 42° dia operacional deve-se à desintegração granular e descarte da biomassa algal e floculenta do sistema ocasionada pela redução do tempo de sedimentação para 8 minutos e depois para 5 min de forma a mitigar os efeitos do nematoide *Aeolosoma hemprichi*, principalmente no F2.

No 51° dia houve aumento nas concentrações de clorofila-a devido a lavagem dos fotobiorreatores e consequentemente, desprendimento de placas de biomassa

algal das paredes que retornaram para o sistema. Esse fenômeno foi relatado por Marinho (2020) que também observou aderência de microalgas na parede dos fotobiorreatores e consequentemente variações nos valores de clorofila-a, atingindo concentrações de 5,23 mg/L.

Durante o experimento, observou-se que apesar de ambos os reatores estarem submetidos a mesma intensidade luminosa, houve maior concentração média de clorofila-a no reator F1. Diante disso, tem-se que a estratégia operacional de pulsos de ar pode ter influenciado positivamente no desenvolvimento de microalgas quando comparados com o F2 (recirculação do sobrenadante).

Figura 23 - “Efeito parede” nos fotobiorreatores (indicados por setas)



Fonte: A autora (2022).

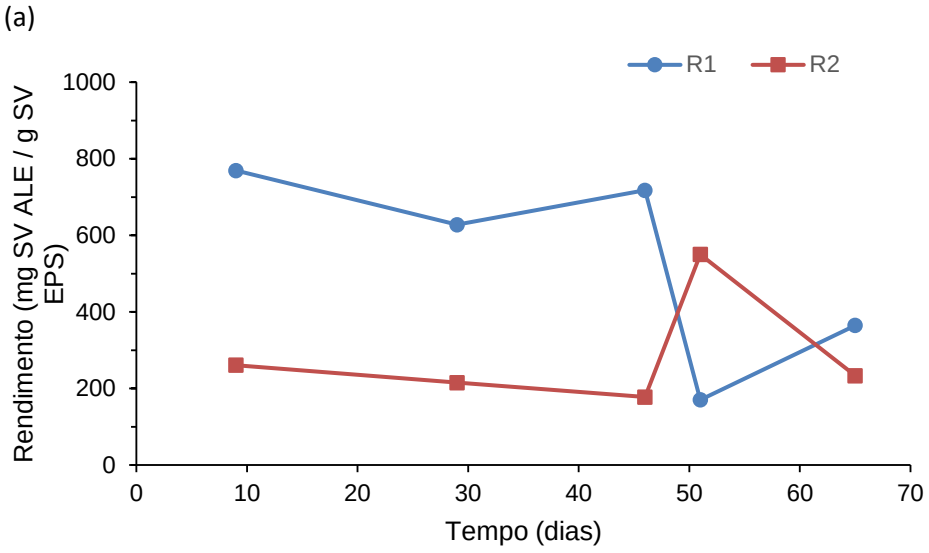
4.3 EXOPOLÍMERO SEMELHANTE A ALGINATO (ALE)

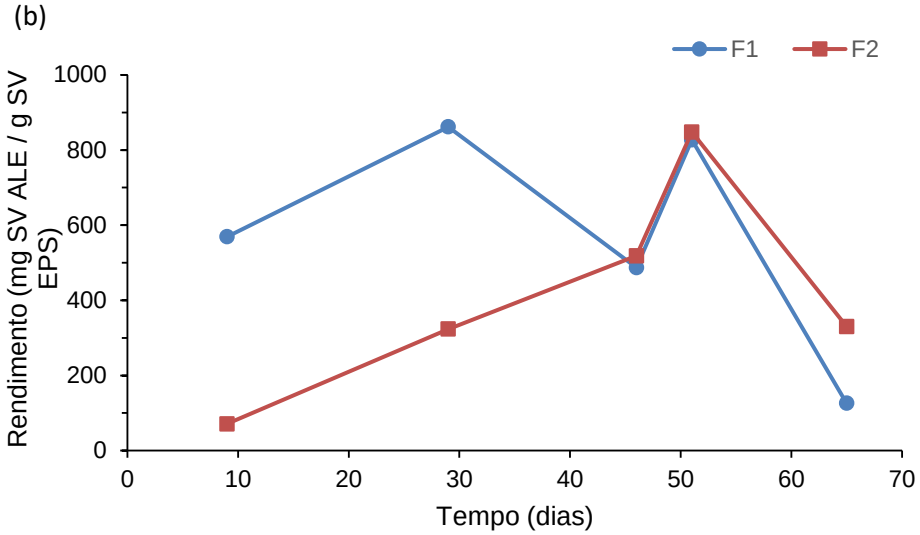
O conteúdo de ALE e EPS foram extraídos dos quatro reatores durante todo o experimento e podem ser observados na Figura 24 e Figura 25. O conteúdo de ALE em EPS nos reatores R1 e R2 se comportaram de formas diferentes, conforme demonstrado na Figura 24a. Ainda nos primeiros dias de operação, o conteúdo de ALE em EPS nesses reatores atingiram cerca de 704,9 ± 71,6 mg VS_{ALE} / g VS_{EPS} para R1 e 217,9 ± 41,7 mg VS_{ALE} / g VS_{EPS} para R2. Essa diferença entre o conteúdo de ALE em R1 e R2 pode estar associada à sua comunidade microbiológica (Figura 32), na qual algumas dessas bactérias estão associadas a produção de EPS.

No entanto, no 51° dia de operação, quando os reatores apresentavam desintegração granular, o conteúdo de ALE em R1 caiu para 170,4 mg / gVS_{EPS} e, em R1 observou-se produção máxima de 550 mg VS_{ALE} / $gVS_{EPS.}$ Esse aumento significativo em R2 pode estar associado ao aumento da DQO de 244,5 mg/L para 336,7 mg/L no afluente, uma vez que foi relatado que altas concentrações de DQO tratando efluente sintéticos em LGA levaram a um maior teor de ALE nos grânulos decorrente do estresse causado aos microrganismos (SCHAMBECK *et al*., 2020). Esses resultados corroboram com Schambeck *et al.* (2020) que ao avaliarem a influência do tipo de afluente (sintética simples, sintética complexa e real) no conteúdo de ALE em EPS em grânulos aeróbios obtiveram cerca de 333 ± 86 mg VS_{ALE} / $gVS_{EPS.}$

Com relação ao conteúdo de ALE nos fotobiorreatores (Figura 24b), foi possível observar que o conteúdo de ALE recuperado em F1 foi superior ao F2 alcançando 686,3 ± 186,3 mgVS_{ALE} / gVS_{EPS} e 390,8 ± 110,7 mgVS_{ALE} / gVS_{EPS}, respectivamente. Por meio destes resultados é possível verificar que o modo de operação por pulso de ar pode ter favorecido a recuperação de ALE nos dois sistemas em relação à operação por recirculação. No entanto, como discorre Carvalho *et al.* (2021), o impacto da taxa de aeração na produção de ALE ainda não foram esclarecidas na literatura e se apresenta como uma lacuna no conhecimento.

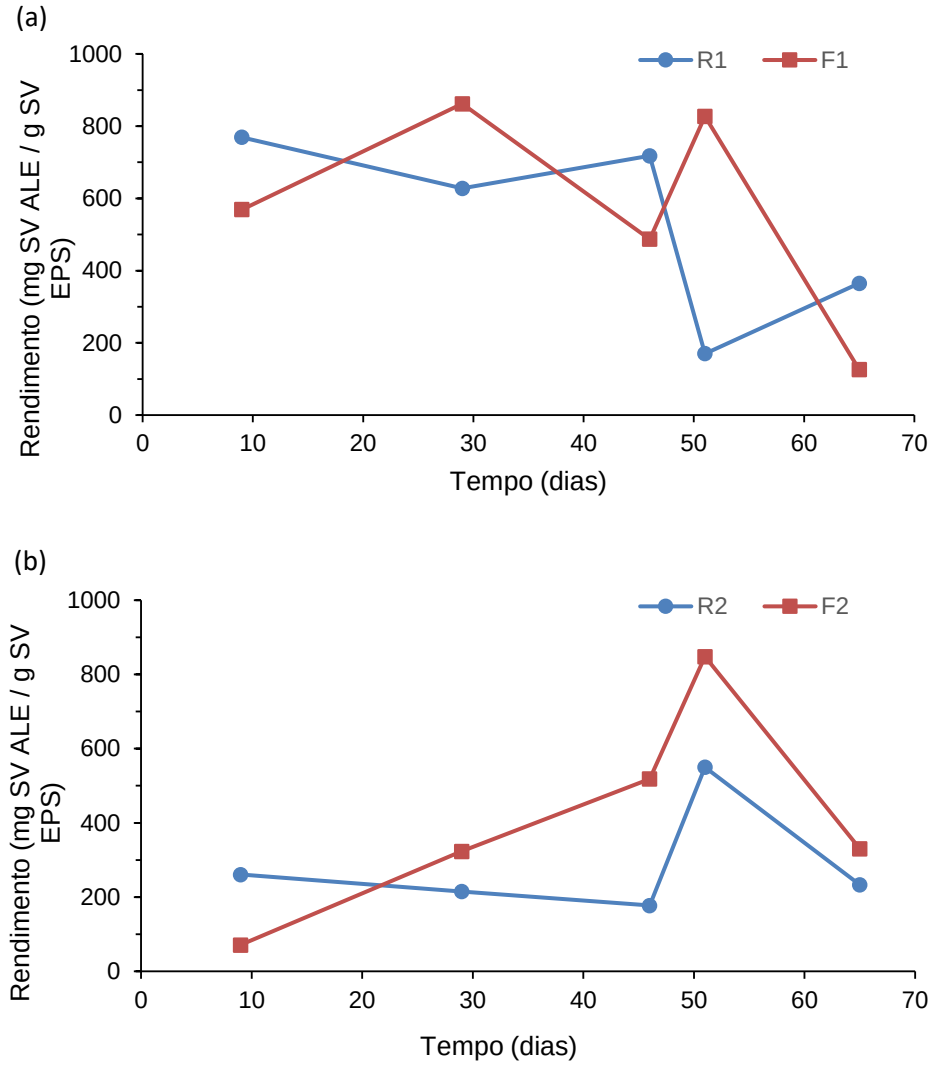
Figura 24 - Conteúdo de ALE no EPS em (a) R1 e R2, e (b) F1 e F2





Fonte: A autora (2022).

Figura 25 - Comparação do conteúdo de ALE no EPS em (a) R1 e F1, e (b) R2 e F2



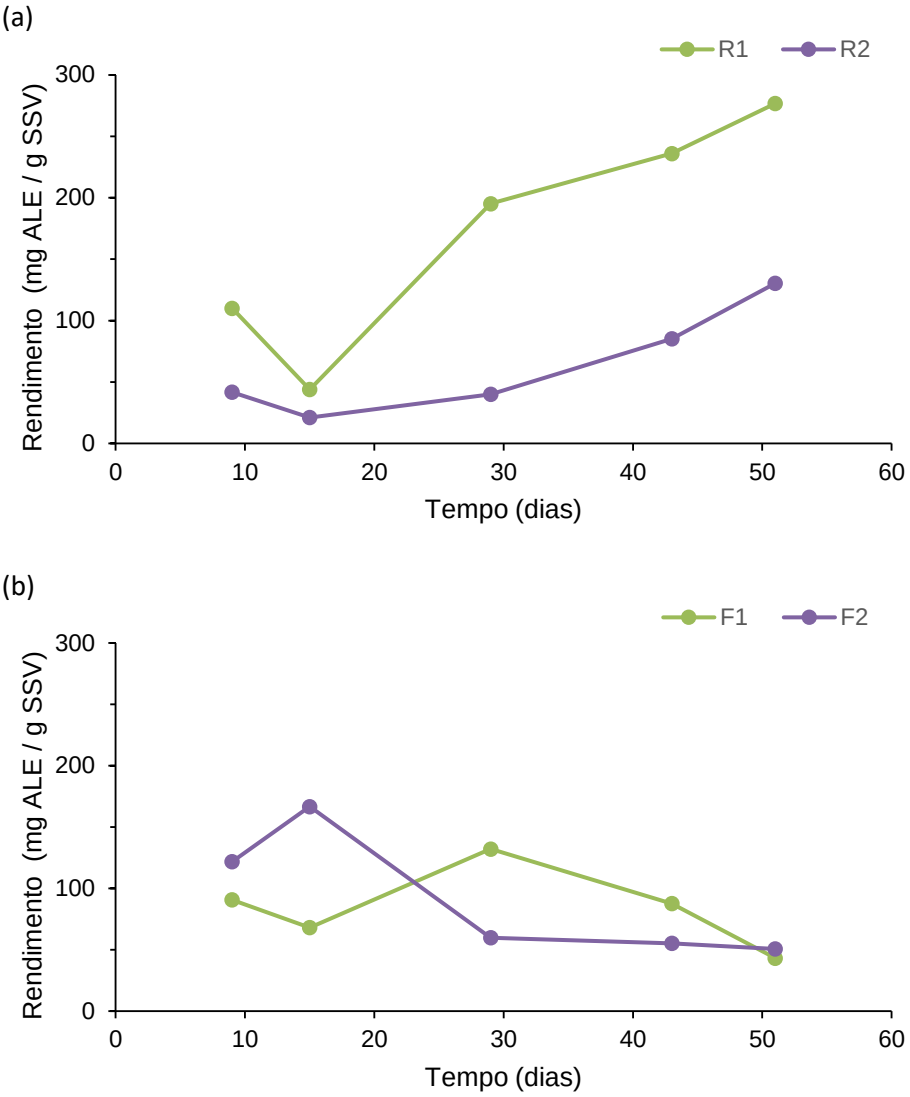
Fonte: A autora (2022).

Ao compararmos o potencial de recuperação de ALE em ambas as biomassas (bacterianos e algal-bacteriano), não houve diferenças significativas em seu conteúdo quando utilizados a estratégia operacional de mistura de biomassa por pulsos de ar (Figura 25a). Por outro lado, quando utilizado a estratégia operacional de recirculação do sobrenadante, percebeu-se um conteúdo maior de ALE no F2, que continha biomassa algal-bacteriana (Figura 25b). Chen *et al.* (2021) ao analisarem o conteúdo de ALE recuperados de LGA e LGAB, verificaram que o conteúdo de ALE em LGAB foi cerca de 2,8 vezes maior do que os recuperados de LGA quando alimentado com águas residuárias sintética.

O conteúdo de ALE na biomassa ao longo do experimento pode ser observado na Figura 26. Quantidades significativas de ALE foram obtidas nos reatores bacterianos, alcançando cerca de 172,4 ± 94,6 mg/gSSV e 63,7 ± 44,0 mg/gSSV, respectivamente. Diante disso, notou-se que o modo de operação por pulsos de ar afetou positivamente na acumulação de ALE em relação à recirculação. Esses valores corroboram com Schambeck *et al* (2020) que observaram uma recuperação de ALE de 236 ± 27 mg/gSSV tratando águas residuárias reais em RBS com LGA.

Em geral, nos reatores com consórcio algal-bacteriano, não houve diferenças significativas no conteúdo médio de ALE na biomassa, alcançando cerca de 84,3 ± 32,7 mg/gSSV para reator com condição de pulsos de ar (F1) e 90,9 ± 51,3 mg/gSSV por recirculação do sobrenadante. O conteúdo de ALE obtido nesse estudo se manteve na faixa dos resultados relatados (32-240 mg/gSSV) na literatura (LIN *et al*., 2015; MENG *et al*., 2020; SCHAMBECK *et al*., 2020).

Figura 26 - Comparação do conteúdo de ALE na Biomassa em (a) R1 e R2, e (b) F1 e F2



Fonte: A autora (2022).

4.4 CONTEÚDO DE POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

Em todos os reatores, o enchimento lento (30 min) foi aplicado para favorecer o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, como os organismos acumuladores de polifosfato (PAO) a partir da hidrólise da matéria orgânica, e consequentemente beneficiar a remoção de fósforo do sistema e a produção de polihidroxialcanoatos (PHA). O perfil de matéria orgânica (DQO), fosfato e teor de PHB na biomassa em todos os reatores, durante o ciclo operacional padrão, estão representados nas Figura 27 e Figura 28.

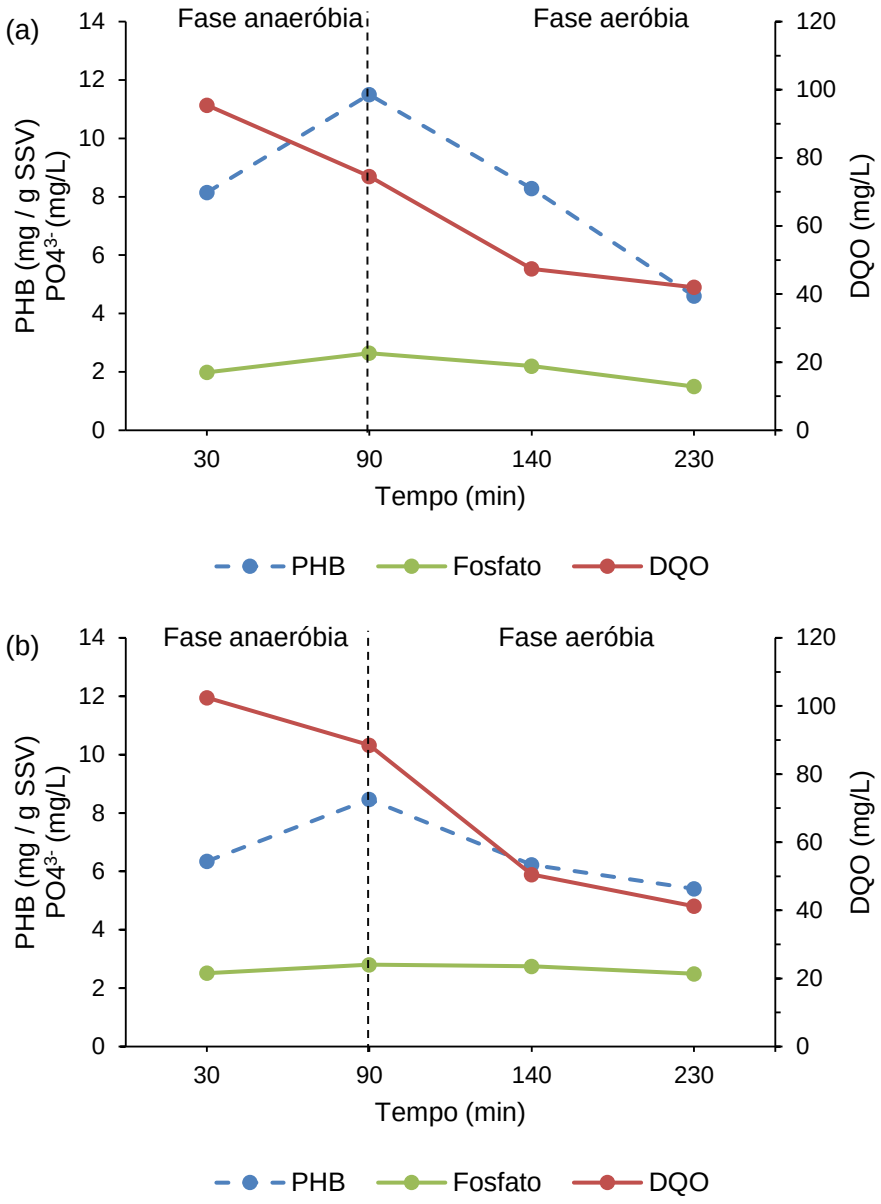
Sob condições anaeróbias, o ácido acético e o isopentanoico, são os principais ácidos graxos voláteis (AGV) presente no sistema em R1 e R2 (Figura 29) que foram

rapidamente armazenados na célula sob a forma de polihidroxibutirato (PHB), uma das principais formas de PHA. O conteúdo de PHB nessa condição durante todo o experimento foi em média 10,4 ± 1,7 mgPHB/gSSV para R1 e 7,9 ± 4,5 mgPHB/gSSV para R2. Por outro lado, a produção de PHB nos fotobiorreatores foi cerca de 5,7 ± 1,6 mgPHB/gSSV e 6,3 ± 0,8 mgPHB/gSSV em F1 e F2, respectivamente. Aparentemente, o modo de operação aplicada por pulsos de ar favoreceu a recuperação de PHB nos reatores bacterianos.

A produção dos PHA requer energia na forma de ATP e poder redutor com a transportador de eletros com o NAD(P)H. Com isso, a hidrólise do polifosfato armazenado intracelularmente e a liberação de fosforo para o meio fornecem parte da energia para essas reações (IZADI, IZADI e ELDYASTI, 2021). No tempo de operação dos reatores neste estudo, foi verificado que o consumo e liberação de fosfato para o meio se manteve constante em todos os reatores, não havendo remoções consideráveis de fósforo (Figura 27 e Figura 28).

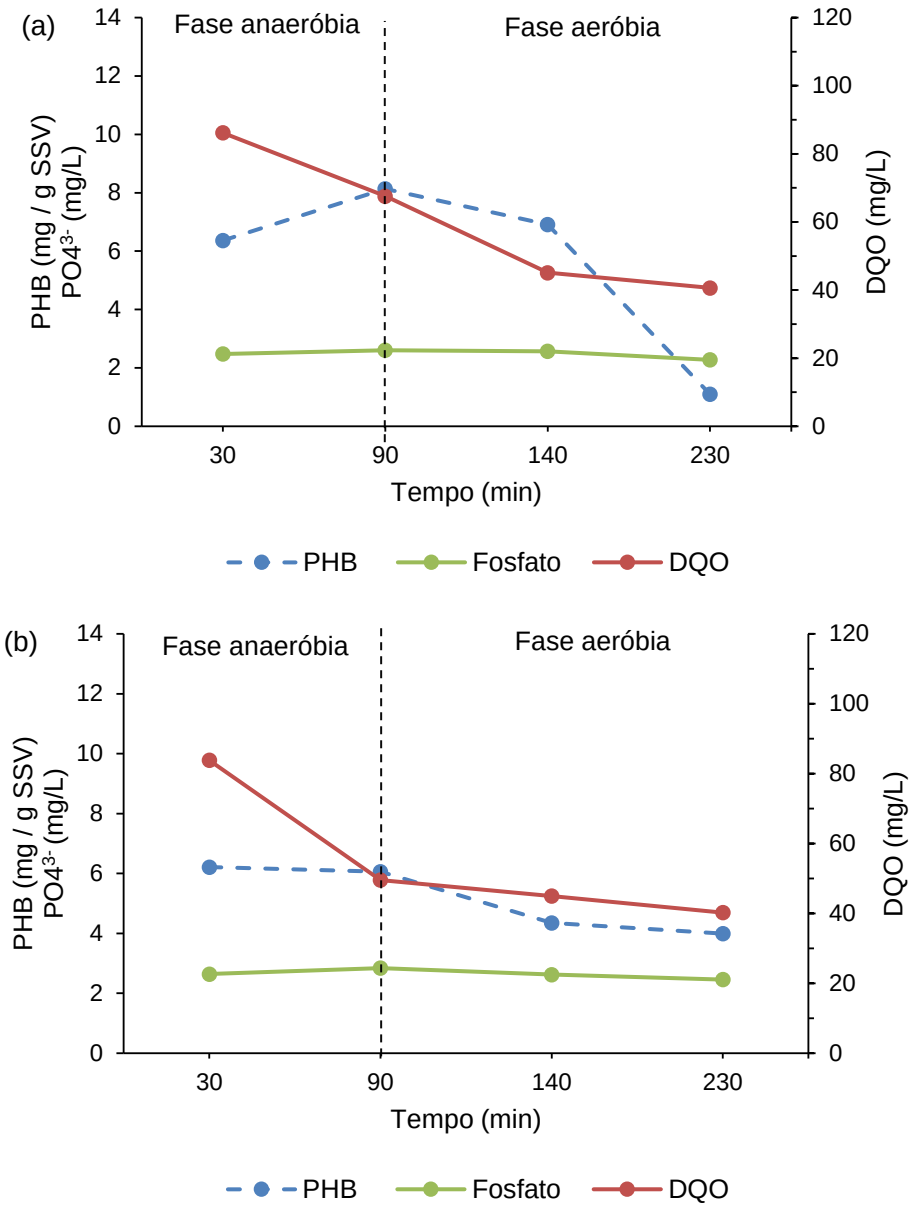
Sob condições aeróbias, quando o oxigênio estava disponível para a respiração, o conteúdo de AGV no meio era escasso (Figura 29 e Figura 30). Com isso, o conteúdo de PHA armazenado intracelularmente pelos PAO é utilizado para manutenção celular à medida que esses microrganismos capturam polifosfato do meio para reconstruir suas reservas e consumo de ATP. Nessas condições, no final da fase de aeração, o conteúdo de PHB atingiu valores mínimos médios em R1 e R2 de 3,6 ± 1,3 mgPHB/gSSV e 2,6 ± 2,5 mgPHB/gSSV, respectivamente. Nos fotobiorreatores foram 1,3 ± 0,2 mgPHB/gSSV para F1 e 2,7 ± 1,2 mgPHB/gSSV para F2.

Figura 27 - Perfil de matéria orgânica (DQO), fosfato e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em R1 (a) e R2 (b)



Fonte: A autora (2021).

Figura 28 - Perfil de matéria orgânica (DQO), fosfato e teor de PHB na biomassa, durante um ciclo operacional padrão em F1 (a) e F2 (b)

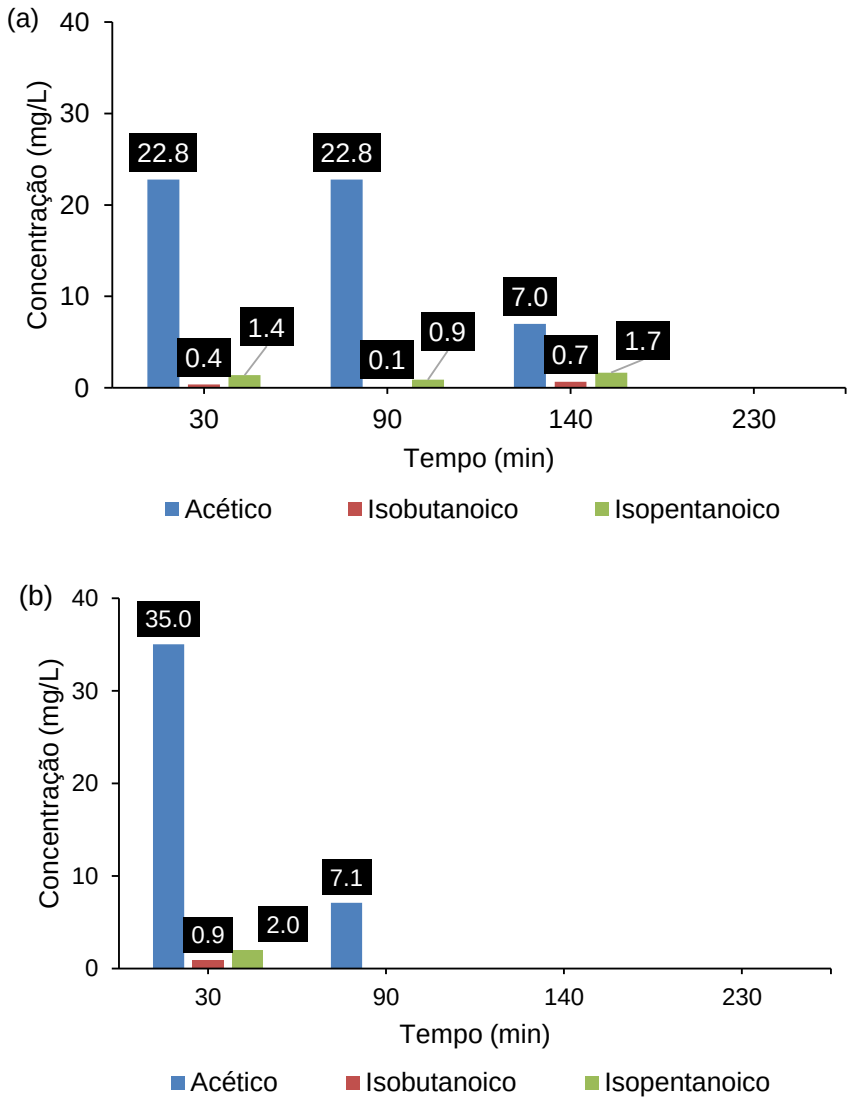


Fonte: A autora (2021).

Segundo Khoo *et al.* (2021), a biossíntese de PHA derivados do consórcio microalgal-bacteriano é uma alternativa sustentável e promissora em relação aos plásticos convencionais à base de petróleo. Fradinho *et al.* (2013) reportaram um teor máximo de PHB de 20% ao utilizarem condição *fest/famine* e substrato a base de acetato em consórcios fotossintéticos de algas e bactérias. Diante disso, estudos enfatizam os benefícios da simbiose algal-bacteriana para a produção de bioplásticos, enquanto discorrem sobre os desafios que enfrentam como custo de capital, demanda de mercado, aceitação pública, dentre outros (KHOO *et al*., 2021; YONG *et al*., 2021).

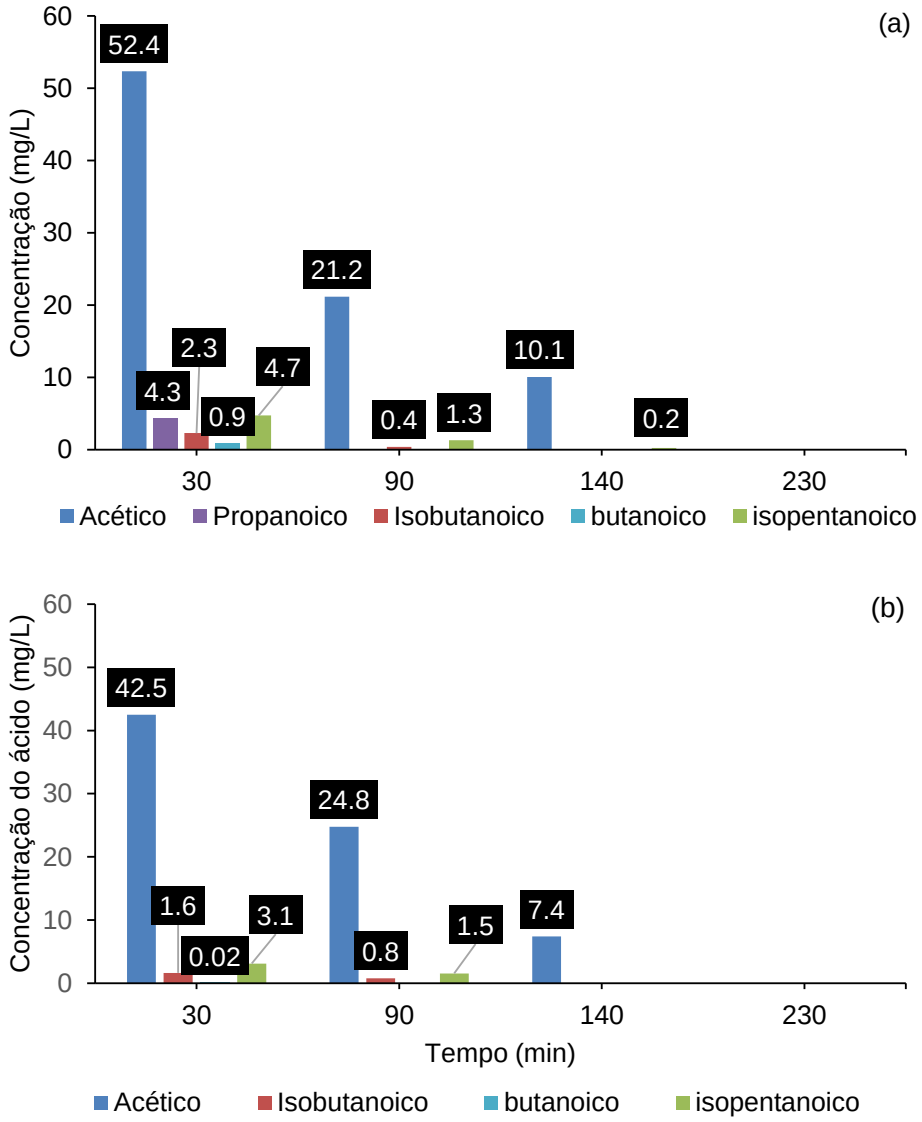
Com relação à composição dos AGV, nota-se maior diversidade nos fotobiorreatores. Entretanto, nos quatro reatores foi possível observar a predominância do ácido acético. Segundo Rollemberg *et al.* (2018), o ácido acético e propanoico aumenta o acúmulo de PHA pelo favorecimento dos PAO.

Figura 29 - Concentração de AGV em R1 (a) e R2 (b) no dia 65



Fonte: A autora (2021).

Figura 30 - Concentração de AGV em F1 (a) e F2 (b) no dia 65

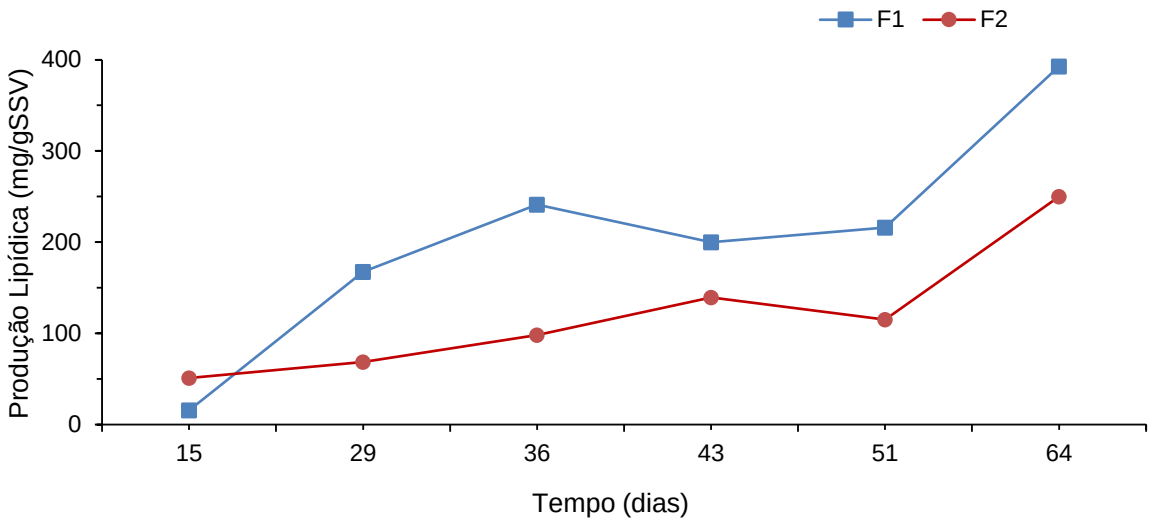


Fonte: A autora (2021).

4.5 PRODUÇÃO LIPÍDICA

O teor e produtividade lipídica também foram monitorados nos fotobiorreatores (F1 e F2) de modo a avaliar a recuperação da biomassa como matéria-prima de valor agregado de águas residuárias para fins de aplicações na biotecnologia LGAB. O conteúdo lipídico médio no fotobiorreator com pulsos de ar (F1) foi levemente maior do que o de recirculação (F2), atingindo 205,5±87,6 mg/gSSV e 120,3±71,0 mg/gSSV, respectivamente (Figura 31). Esses resultados corroboram com Huang *et al.* (2020) que verificaram um aumento significativo no conteúdo lipídico com o crescimento de algas em sistema LGAB tratando águas residuárias.

Figura 31 - Produção Lipídica nos fotobiorreatores F1 e F2



Fonte: A autora (2021).

Por outro lado, no 35° dia de operação, quando o sistema possuía grânulos, foi possível observar em F2, teor lipídico de 241,1 mg/gSSV e 98,1 mg/gSSV para F2. O aumento no conteúdo de lipídios ao longo do experimento em ambos os reatores pode estar relacionado ao “efeito parede”, isto é, ao crescimento de microalgas na parede do reator, que ao ser retirado da parede pode ter aumentado o teor de lipídios.

Em geral, a produção lipídica total em F1 e F2 foi, em média, 20,5% e 12,0%, respectivamente. Em geral, teores lipídicos de 30% é comum na maioria das espécies de algas, podendo ainda, observar teores elevados em algumas espécies como a *Nannochloris* sp. (56%), *Chlorella* sp. (58%) e a *Neochloris oleabundans* (65%), conforme descrito por Sajjadi *et al*. (2018).

Meng *et al.* (2019), ao avaliarem o efeito da iluminação na produção lipídica em fotobiorreatores aeróbios, utilizando a estratégia de 12h:12h (claro:escuro) aplicando intensidade luminosa de 135 μmol/m^2.s obtiveram o teor lipídico de 54,4 mg/gSST e sob iluminação de 225 μmol/m^2.s alcançaram o teor de 59,6 mg/gSST, indicando que a iluminação favorece o aumento da produção lipídica. Por outro lado, a maior produção lipídica em fotogrânulos aeróbios estão associadas a iluminação, nitrificação parcial e acúmulo de ácido nitroso livre (HUANG *et al*., 2020; ZHANG, HUO e MENG, 2020).

4.6 DINÂMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA

As estruturas microbiologias identificadas a nível de gênero e suas abundâncias relativas no inóculo (R_0) e nos grânulos aeróbios durante o 29° dia (R1-2 e R2-2) e no 64° dia (R1-2 e R2-2) no qual correspondia respectivamente, às fases de granulação parcial e falha do sistema, podem ser visualizadas na Figura 32. No geral, foram encontrados nas amostras 729 gêneros microbianos, dessas cerca de 26,3% não foram classificadas pelo processamento no banco de dados SILVA *ribosomal RNA gene database Project* (QUAST *et al*, 2013). A discussão será feita com base nos dez gêneros com maior abundância relativa atribuídas no processamento deste banco de dados.

Mudanças significativas na composição da comunidade microbiológica foram observadas ao longo do experimento. Durante a partida dos reatores, com a adição do inóculo, a comunidade microbiana foi dominada por microrganismos dos gêneros *Clostridium* (12,3%) e *Exiguobacterium* (11,1%). Outras populações menores, como *Acidithiomicrobium* (3,1%), *Brucella* (2,8%), *Brevundimonas* (2,5%), *Hyphomicrobium* (2,4%), *Acidimicrobium* (2,2%)*, Sphingobacterium* (2,1%) *e Comamonas* (2%), foram observadas no 1° dia.

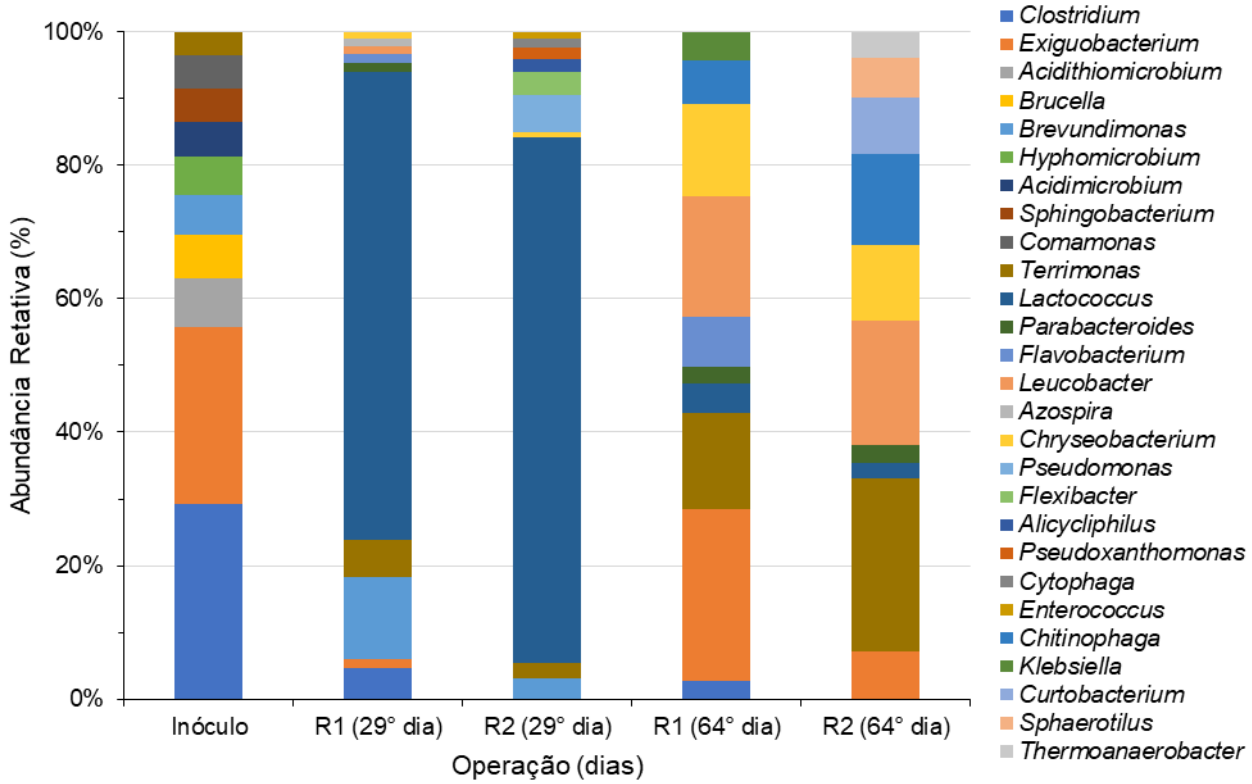
Os representantes do gênero *Clostridium* são estritamente anaeróbios (CADORET *et al*., 2017), caracterizados por serem organismos acumuladores de fósforo desnitrificantes (DPAO's, do inglês - *denitrifying phosphorus accumulation organisms)* que passaram de 12% (lodo do inóculo) para 2,7 % (R1-1) e 1,4 % (R1-2). Portanto, a diminuição da abundância relativa desse gênero deve-se ao pequeno tamanho dos grânulos obtidos, uma vez que, foi relatado que bactérias anaeróbias geralmente residem a uma profundidade entre 0,8-1,0 mm em LGA (ZHANG *et al*., 2019). Nesse contexto, alguns estudos associam o aumento da abundância relativa do gênero *Clostridium* ao grande tamanho dos grânulos alcançados e à existência de uma zona anaeróbia em seu núcleo (CADORET *et al*., 2017; ZHANG *et al*., 2019).

Já os representantes do gênero *Exiguobacterium* notou-se melhor adaptação no R1, passando de 11% (lodo inóculo) para 13% em R1-2 e 3,7% em R2-2. Neste grupo microbiano estão presente bactérias associadas a alta excreção de EPS e formação de LGA (ZHAO *et al.,* 2021).

Os gêneros mais abundantes em R1 e R2 no 29° dia de operação foram, *Lactococcus* (40%) e *Brevundimonas* (7%) para R1 e *Lactococcus* (50%) e

Pseudomonas (4%) para R2. As bactérias do gênero *Lactococcus* são frequentemente associadas à excreção de EPS em LGA (ZHANG *et al*., 2019), o que pode justificar os valores discutidos na seção 2.5.1. Já o gênero *Pseudomonas* podem ser responsáveis pela degradação de compostos orgânicos, desnitrificação e acúmulo de fósforo, contribuindo para a produção de PHA, como visto na seção 2.5.2, esses microrganismos são versáteis e podem ser encontrados em diversos ambientes naturais e reatores biológicos, como o LGA (Zhao *et al.*, 2021).

Figura 32 - Dinâmica da composição da comunidade microbiana em inóculo, R1-1 e R2-1 (29° dia) e R1-2 e R2-2 (64° dia) de operação.



Fonte: A autora (2022).

Os *Lactococcus* que no 29° dia foi predominante no sistema, não permaneceram com essa abundância até o 64° dia, passando de 40% (dia 29) em R1-1 para 2,4% (dia 64) e de 50% (29) em R2-1 para 1,3% (dia 64). Essa redução significativa pode estar associada a desintegração dos grânulos e consequentemente ausência de uma zona anaeróbia no grânulo, onde esse gênero reside (ZHANG *et al*., 2019).

No 64° dia de operação, os gêneros com maiores abundâncias relativas em R1 foram *Exiguobacterium* (14%), *Leucobacter* (10%), *Terrimonas* (8%)

Chryseobacterium (8%), e *Terrimonas* (13%), *Leucobacter* (10%), *Chitinophaga* (7%) e *Chryseobacterium* (6%) para R2. Nesse período, o sistema apresentou poucos ou nenhum grânulo como discutido anteriormente. A biomassa apresentou características fibrilosas (Figura 12 e Figura 13), sem formato bem definido. Segundo Fan *et al*. (2018) que também identificaram *Leucobacter* em estudo de granulação aeróbia em RBS discorre que esse gênero pode secretar EPS em excesso, servindo de precursor na formação de LGA. Logo, a agregação da biomassa observada no 64° dia operacional (Figura 12 e Figura 13) pode estar associada a esse gênero em específico.

Por fim, foram analisados os índices de riqueza (Chao) e diversidade bacteriana (Shannon e Simpson). Os índices Chao seguiram a ordem R_0>R1-2>R1-1 em R1 e R_0>R2-2>R2-1 em R2, respectivamente, indicando que riqueza bacteriana em ambos os reatores diminuiu com a extensão do tempo operacional e granulação do sistema (dia 29) e tendeu a aumentar com a desintegração dos grânulos (dia 64). Além disso, a diversidade bacteriana também diminuiu durante o processo de granulação em termos de valores de Shannon, diminuindo de 3,56 no inóculo para 2,12 em R1 e 1,56 em R2 no dia 29. Esses resultados corroboram com Geng *et al.* (2021) que observaram a diminuição da riqueza e diversidade bacteriana com o processo de granulação, diminuindo em termos de diversidade (Shannon) de 5,41 no inóculo para 3,25.

5 DISCUSSÃO INTEGRADA

A recuperação de recursos de alto valor agregado a partir do lodo excedente em ETE pode contribuir para a economia circular, trazendo benefícios tanto econômicos quanto ambientais para a sociedade. Nesse contexto, o presente estudo objetivou comparar o desempenho de recuperação de bioprodutos ALE, PHB e produção lipídica tratando esgoto sanitário sintético de baixa concentração (DQO=280,8 ± 53,6 mg/L) através da aplicação de duas condições operacionais de mistura da biomassa (pulsos de ar e recirculação do sobrenadante) aplicadas em RBS com tecnologia LGA (R1, R2) e LGAB (F1, F2).

Quanto à formação de biomassa no sistema, foi observado que as condições de operação e as configurações das fases dos ciclos favoreceu o desenvolvimento de LGA e LGAB, com concentrações em torno de 2,6 gSSV/L para biomassa bacteriana (R1) e 1,9 gSSV/L para algal-bacteriana (F1) quando submetidos a estratégia de mistura da biomassa por pulsos de ar. Concentrações de biomassa de aproximadamente 3,3 gSSV/L e 1,9 gSSV/L foram obtidos em reatores bacterianos (R2) e algal-bacterianos (F2), nessa ordem, com a utilização da estratégia de recirculação do sobrenadante. Com relação ao desenvolvimento de grânulos, a partida dos reatores com adição de inóculo de lodo ativado favoreceu a rápida granulação (22 dias) com diâmetros superiores a 0,2 mm em ambos os reatores. Por outro lado, nos fotobiorreatores, a granulação foi observada após o 21° dia para F1 e 35° dia para F2. O surgimento das primeiras microalgas ocorreu apenas no 21° dia e se estabeleceu no sistema até o final do experimento.

O conteúdo de ALE utilizando a estratégia de pulsos de ar foi superior ao de recirculação do sobrenadante (R1 e R2: 172,4 ± 94,6 mg/gSSV e 63,7 ± 44,1 mg/gSSV, respectivamente). Indicando que o pulso de ar pode ter contribuído para o maior acúmulo de ALE nos reatores bacterianos. Por outro lado, nos fotobiorreatores, a estratégia de mistura da biomassa não contribuiu diretamente no conteúdo de ALE, uma vez que se manteve constante em ambos os reatores (F1: 84,3 ± 32,7 mg/gSSV e F2: 90,9 ± 51,3 mg/gSSV). Com relação ao acúmulo de ALE nas diferentes biomassas, observou-se um desempenho superior os reatores bacterianos.

O conteúdo de PHB nos reatores bacterianos foram superiores aos fotobiorreatores. Sob condições anaeróbias, a aplicação da estratégia operacional de pulsos de ar apresentou influência positiva na recuperação de PHB em relação a

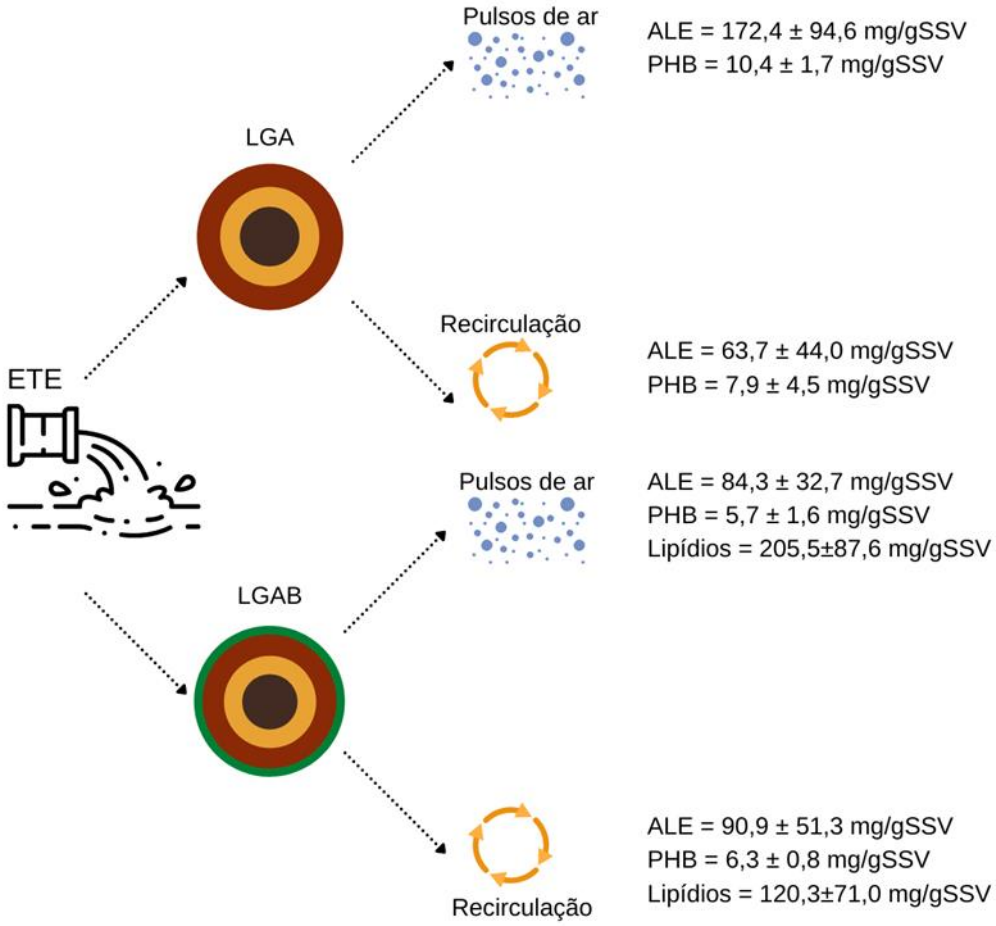
estratégia de recirculação do esgoto sobrenadante nos reatores bacterianos, alcançando concentrações médias de 10,4 ± 1,7 mgPHB/gSSV quando utilizado estratégia de pulsos de ar e 7,9 ± 4,5 mgPHB/gSSV para reator submetido a recirculação do esgoto sobrenadante. Nos fotobiorreatores, a produção de PHB foi cerca de 5,7 ± 1,6 mgPHB/gSSV (pulsos de ar) e 6,3 ± 0,8 mgPHB/gSSV (recirculação) em F1 e F2, respectivamente.

Além da recuperação de bioprodutos em LGAB, observou-se o potencial de produção lipídica utilizando as duas estratégias de mistura de biomassa. O conteúdo lipídico médio no fotobiorreator com pulsos de ar (F1) foi aproximadamente 40% superior ao fotobiorreator submetido a recirculação (F2), atingindo 205,5±87,6 mg/gSSV e 120,3±71,0 mg/gSSV, respectivamente. Esses valores coincidem com os resultados de clorofila-a, onde observou-se um conteúdo médio de 5,0 mg/gSSV para F1 e 3,4 mg/gSSV para F2, indicando um maior conteúdo de microalgas responsáveis pela acumulação lipídica no reator submetido a pulsos de ar.

Por meio de análise de biologia molecular nos reatores bacterianos, foi observado que organismos do gênero *Lactococcus* estavam presentes (R1:40% e R2:50%) no período granular do sistema e foram relacionados à excreção de EPS (ZHANG *et al*., 2019). Nesse período, observou-se também a presença de *Brevundimonas* (7%) no reator submetido a pulsos de ar e *Pseudomonas* (4%) no reator com recirculação. No período de desintegração granular (64° dia) observou-se a presença de microrganismos dos gêneros com maiores abundâncias relativas foram *Exiguobacterium* (14%), *Leucobacter* (10%), *Terrimonas* (8%) *Chryseobacterium* (8%) em R1 e *Terrimonas* (13%), *Leucobacter* (10%), *Chitinophaga* (7%) e *Chryseobacterium* (6%) para R2.

A presença de *Leucobacter* em sistema LGA está relacionado a secreção de EPS em excesso, servindo de precursor na formação de LGA (FAN *et al*., 2018) pode justificar o aumento no conteúdo de ALE nesse período, uma vez que uma fração de EPS corresponde à ALE. O resumo dos principais resultados encontra-se demostrado na Figura 33.

Figura 33 - Resumo esquemático dos principais resultados



Fonte: A autora (2022).

6 CONCLUSÕES

O estudo apresenta o comparativo entre o sistema de LGA e LGAB na recuperação de biopolímeros (ALE e PHA) e de produção lipídica em LGAB a partir da aplicação de duas estratégias operacionais: mistura da biomassa por pulsos de ar e recirculação do sobrenadante. A granulação nos reatores bacterianos foi alcançada com 22 dias de operação, assim como no fotobiorreator F1. No entanto, a granulação em F2 só foi alcançada com 35 dias de operação.

Além disso, este estudo destacou o potencial de produção/recuperação de ALE no reator bacteriano operado com pulsos de ar (R1) foi superior ao de recirculação do esgoto sobrenadante, no qual alcançaram cerca de 172,4 ± 94,6 mg/gSSV e 63,7 ± 44,1 mg/gSSV para R1 e R2, respectivamente. A recuperação de ALE na biomassa algal-bacteriana não apresentou diferenças estatísticas significativas entre as duas estratégias aplicadas (F1: 84,3 ± 32,7 mg/gSSV e F2: 90,9 ± 51,3 mg/gSSV). Com relação à recuperação de PHB, a estratégia de pulsos de ar favoreceu o acúmulo de PHB nos reatores bacterianos (R1: 10,4 ± 1,7 mgPHB/gSSV e R2: 7,9 ± 4,5 mgPHB/gSSV). No entanto, foi demonstrado que a produção de PHB em LGA foi superior aos recuperados em LGAB (F1: 5,7 ± 1,6 mgPHB/gSSV e F2: 6,3 ± 0,8 mgPHB/gSSV. Por fim, verificou-se que o conteúdo lipídico médio no fotobiorreator com pulsos de ar (F1) foi aproximadamente 40% superior ao fotobiorreator submetido a recirculação (F2), atingindo cerca de 205,5±87,6 mg/gSSV e 120,3±71,0 mg/gSSV, respectivamente.

Em síntese, o estudo apresentou resultados promissores para a aplicação das tecnologias LGA e LGAB para a recuperação de biopolímeros no tratamento de esgoto doméstico de baixa carga orgânica e clima tropical (29,0 ± 2,0 °C), contribuindo para a “economia circular”. Entretanto, faz-se necessário sua aplicação em escala piloto, além de avaliar sua viabilidade técnica, econômica e ambiental para fins de aplicação em larga escala.

7 RECOMENDAÇÕES

Ao analisar os resultados e conclusões obtidos nesta pesquisa, algumas recomendações serão apresentadas para o desenvolvimento de trabalhos futuros:

- Aumentar o período de monitoramento dos reatores de modo a alcançar a granulação completa e estabilidade do sistema;
- Analisar a composição dos subprodutos gerados (ALE, PHA e Lipídios) recuperados neste estudo;
- Implantar o sistema de LGA em escala piloto para fins de recuperação de biopolímeros (ALE e PHA) e produção lipídica.

REFERÊNCIAS

ABOUHEND, A. S. *et al.* The Oxygenic Photogranule Process for Aeration-Free Wastewater Treatment. **Environmental Science and Technology**. 2018.

AHMAD, J. S. M. *et al*. Algal-bacterial aerobic granule based continuous-flow reactor with effluent recirculation instead of air bubbling: Stability and energy consumption analysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, p. 100215, 2019.

AKABOCI, T. R. V. **Tratamento de esgoto sanitário em reator em bateladas sequenciais: desempenho do processo e modelagem matemática**. Dissertação. 169 p. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): Florianópolis, 2013.

ALVES, O. I. M. **Aspectos microbiológicos do tratamento de esgotos sanitários em reatores em batelada sequencial com lodo granular**. Dissertação. 95p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

APHA, AWWA, and WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22th ed. **Baltimore**: Port City Press, 2012.

AQEEL, H. *et al*. Microbial dynamics and properties of aerobic granules developed in a laboratory-scale sequencing batch reactor with an intermediate filamentous bulking stage. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 447-460, 2016.

Azmah, S. A. *et al*. A review on third generation bioethanol feedstock. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 65, 756–769, 2016.

BEUN, J. J. *et al*. Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 33, n. 10, p. 2283–2290, 1999.

BIN, Z. *et al*. Dynamic and distribution of ammonia-oxidizing bacteria communities during sludge granulation in an anaerobic–aerobic sequencing batch reactor. **Water Research**, v.45, p.6207-6216, 2011.

CADORET, F. *et al*. Noncontiguous finished genome sequences and description of Bacillus massiliglaciei, Bacillus mediterraneensis, Bacillus massilinigeriensis, Bacillus phocaeensis and Bacillus tuaregi, five new species identified by culturomics. **New microbes and new infections**, v. 19, p. 45-59, 2017.

CAO, L. *et al*. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 242, p. 116389, 2020.

CAPORASO, J. G. *et al*. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

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, p. 129881, 2021.

CHANDRA, D. *et al*. Field performance of bacterial inoculants to alleviate water stress effects in wheat (Triticum aestivum L.). **Plant and Soil**, p. 261–281, 2019.

CHEN, Guo-Qiang. Industrial production of PHA. In: Plastics from bacteria. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 121-132, 2010.

CHEN, X. *et al.* Simultaneous recovery of phosphorus and alginate-like exopolysaccharides from two types of aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, p. 126411, 2021.

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.

CYBIS, L. F., PINTO, C. R. R. Protozoários e metazoários presentes em reatores sequenciais em batelada (RSB) observados no processo de nitrificação. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 19, 1997. Foz do Iguaçu, **Anais**. Foz do Iguaçu, ABES. p. 793-802, 1997.

DANTAS, B. K. S. F. **Formação de lodo granular aeróbio em reatores em bateladas sequenciais para o tratamento de esgoto doméstico de baixa carga visando à remoção de nutrientes**. Dissertação. 95p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

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**, 90 (6), 761-769, 2005.

DE KREUK, M. K., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Formation of aerobic granules with domestic sewage. **Journal of Environmental Engineering**. 132 (6), 694-697, 2006.

DE LIMA, I. B. *et al.* Estimativa de consumo de energia em Estações de Tratamento de Água (ETAs) em função da população abastecida. **XIV Seminário de Meio Ambiente e Energias Renováveis**. ITAJUBÁ – MG, 2019.

DERLON, Nicolas *et al*. Formation of aerobic granules for the treatment of real and low-strength municipal wastewater using a sequencing batch reactor operated at constant volume. **Water Research**, v. 105, p. 341-350, 2016.

DU, B. *et al.* Impacts of long-term exposure to tetracycline and sulfamethoxazole on the sludge granules in an anoxic-aerobic wastewater treatment system. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 67–77, 2019.

FALLAHI, A. *et al*. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, p. 129878, 2021.

FAN, Xiao-Yan *et al*. Shifts in bacterial community composition and abundance of nitrifiers during aerobic granulation in two nitrifying sequencing batch reactors. **Bioresource technology**, v. 251, p. 99-107, 2018.

FARIED, M. *et al.* Produção de biodiesel a partir de microalgas: Processos, tecnologias e avanços recentes. **Revisões de energias renováveis e sustentáveis**, v. 79, p. 893-913, 2017.

FELZ, S. *et al*. Aerobic granular sludge contains Hyaluronic acid-like and sulfated glycosaminoglycans-like polymers. **Water research**, v. 169, p. 115291, 2020.

FELZ, S. *et al*. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. JoVE. **Journal of Visualized Experiments**, n. 115, p. e54534, 2016.

FERNÁNDEZ-DACOSTA, C. *et al*. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. **Bioresource technology**, v. 185, p. 368-377, 2015.

FERREIRA, T. J. T. *et al*. Integrated review of resource recovery on aerobic granular sludge systems: Possibilities and challenges for the application of the biorefinery concept. **Journal of Environmental Management**, v. 291, p. 112718, 2021.

FOLADORI, P. *et al.* Enhanced nitrogen removal and energy saving in a microalgal-bacterial consortium treating real municipal wastewater. **Water Science and Technology**. v. 78, p. 174–182. 2018.

FRADINHO, J. C. *et al*. Polyhydroxyalkanoates production by a mixed photosynthetic consortium of bacteria and algae. **Bioresource technology**, v. 132, p. 146-153, 2013.

FRANCA, R. D. G. *et al*. Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 228–246, 2018.

GAO, D. *et al.* Aerobic granular sludge: Characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 137–152, 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.

GENG, Mingyue *et al*. Impact of fungal pellets dosage on long-term stability of aerobic granular sludge. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125106, 2021.

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

HAMZA, R. *et al*. A review of the state of development of aerobic granular sludge technology over the last 20 years: Full-scale applications and resource recovery. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering**, p. 100173, 2022.

HAY, L. D. *et al*. Microbial alginate production, modification and its applications. **Microbial biotechnology**, v. 6, n. 6, p. 637-650, 2013.

HE, Q. *et al*. Unraveling characteristics of simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal (SNDPR) in an aerobic granular sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**. 220, 651–655, 2016.

HEALY, M. G. *et al*. Resource recovery from sewage sludge. **Sewage Treatment Plants**, p. 139, 2020.

HUANG, W. *et al.* Achieving partial nitrification and high lipid production in an algal-bacterial granule system when treating low COD/NH4–N wastewater. **Chemosphere**, v. 248, p. 126106, 2020.

HUANG, W. *et al*. Effect of algae growth on aerobic granulation and nutrients removal from synthetic wastewater by using sequencing batch reactors. **Bioresource technology**, v. 179, p. 187-192, 2015.

INDARTI, E. *et al*. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 2-3, p. 161-170, 2005.

IZADI, Parnian; IZADI, Parin; ELDYASTI, Ahmed. A review of biochemical diversity and metabolic modeling of EBPR process under specific environmental conditions and carbon source availability. **Journal of Environmental Management**, v. 288, p. 112362, 2021.

JI, X. *et al.* The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 247, n. September 2017, p. 44–50, 2018.

KARR, Dale B.; WATERS, James K.; EMERICH, David W. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in Rhizobium japonicum bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. **Applied and environmental microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1339-1344, 1983.

KHOO, Kuan Shiong *et al*. Microalgal-bacterial consortia as future prospect in wastewater bioremediation, environmental management and bioenergy production. **Indian Journal of Microbiology**, p. 1-8, 2021.

KIM, N. K. *et al*. Flame retardant property of flax fabrics coated by extracellular polymeric substances recovered from both activated sludge and aerobic granular sludge. **Water research**, v. 170, p. 115344, 2020.

KOTCHER, John; MAIBACH, Edward; CHOI, Wen-Tsing. Fossil fuels are harming our brains: identifying key messages about the health effects of air pollution from fossil fuels. **BMC public health**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2019.

KOURMENTZA, C. *et al*. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 55, 2017.

KUMAR, M. *et al*. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. **Journal of Cleaner Production**, v. 263, p. 121500, 2020.

LAYER, Manuel *et al*. Organic substrate diffusibility governs microbial community composition, nutrient removal performance and kinetics of granulation of aerobic granular sludge. **Water research** X, v. 4, p. 100033, 2019.

LEE, C. S. *et al.* Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. **Bioresource Technology**, v. 68, 2015.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, Young-Shin; HAN, Gee-Bong. Complete reduction of highly concentrated contaminants in piggery waste by a novel process scheme with an algal-bacterial symbiotic photobioreactor. **Journal of environmental management**, v. 177, p. 202-212, 2016.

LEITE, G. B., ABDELAZIZ, A. E. M., & HALLENBECK, P. C. Algal biofuels: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, 145, 134–141, 2013.

LI, B. *et al.* Effect of TiO2nanoparticles on aerobic granulation of algal-bacterial symbiosis system and nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 214–220, 2015.

LIANG, P., HUANG, X., QIAN, Y. Excess sludge reduction in activated sludge process through predation of Aeolosoma hemprichi. **Biochemical Engineering Journal**. 28, 117-122, 2006.

LIN, Y. *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.

LIU, Xiaoying *et al.* Investigation of extracellular polymeric substances (EPS) in four types of sludge: Factors influencing EPS properties and sludge granulation. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101924, 2021.

LIU, Y.; TAY, J. H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, v. 36, n. 7, p. 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.

MANAVI, Narges; KAZEMI, Amir Sadegh; BONAKDARPOUR, Babak. The development of aerobic granules from conventional activated sludge under anaerobic-aerobic cycles and their adaptation for treatment of dyeing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 312, p. 375-384, 2017.

MANNINA, G. *et al*. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: a review. **Bioresource technology**, v. 297, p. 122478, 2020.

MARINHO, T. J. T. **Cultivo de consórcio granular algal-bacteriano em fotobioreatores em bateladas sequenciais visando à remoção de nutrientes e matéria orgânica**. Dissertação. 95p. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2020.

MENG, F. *et al*. Application of aerobic granules-continuous flow reactor for saline wastewater treatment: Granular stability, lipid production and symbiotic relationship between bacteria and algae. **Bioresource technology**, v. 295, p. 122291, 2020.

MENG, F., *et al.,* Effects of light intensity on oxygen distribution, lipid production and biological community of algal-bacterial granules in photo-sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**. v. 272, p. 473-481, 2019.

METCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. **McGraw Hill Brasil**, 2015.

MISHIMA, K.; NAKAMURA, M. Self-immobilization of aerobic activated sludge–a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment. **Water Science and Technology**, v. 23, n. 4-6, p. 981-990, 1991.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. Alginate biosynthesis and biotechnological production. In: Alginates and their biomedical applications. **Springer**, Singapore, 2018.

MOURÃO, J. M. M. *et al*. Post-treatment of swine wastewater using aerobic granular sludge: Granulation, microbiota development, and performance. **Bioresource Technology Reports**, v. 16, p. 100862, 2021.

MOŻEJKO-CIESIELSKA, Justyna; KIEWISZ, Robert. Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous?. **Microbiological Research**, v. 192, p. 271-282, 2016.

MURUJEW, O. *et al*. Recovery and reuse of alginate in an immobilized algae reactor. **Environmental technology**, v. 42, n. 10, p. 1521-1530, 2021.

NIZAMI, Abdul-Sattar *et al*. Waste biorefineries: enabling circular economies in developing countries. **Bioresource technology**, v. 241, p. 1101-1117, 2017.

PRONK, M. *et al.* Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. **Water Research**, v. 84, p. 207-217, 2015.

PUYOL, D. *et al*. Resource recovery from wastewater by biological technologies: opportunities, challenges, and prospects. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2106, 2017.

QUAST C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. **The SILVA ribosomal RNA gene database project**: improved data processing and web-based tools, 2013.

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*. 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.

ROLLEMBERG, S. L. S. *et al.* Tecnologia de lodo granular aeróbio no tratamento de esgoto doméstico: oportunidades e desafios. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, p. 439-449, 2020b.

ROSMAN, N. H. *et al*. Cultivation of aerobic granular sludge for rubber wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 620-623, 2013.

SAJJADI, B. *et al*. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200-232, 2018.

SALES, Marcos Adriano Marques Pessoa. **Aplicação de lodo granular aeróbio e consórcio algal-bacteriano no tratamento de esgoto doméstico**: efeito de diferentes condições operacionais e composições afluentes. 2020. Qualificação de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

SARKAR, Rajesh Dev; SINGH, Hidam Bishworjit; KALITA, Mohan Chandra. Enhanced lipid accumulation in microalgae through nanoparticle-mediated approach, for biodiesel production: A mini-review. **Heliyon**, v. 7, n. 9, p. e08057, 2021.

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, p. 110394, 2020.
SCHWARZENBECK, N., ERLEY, R., WILDERER, P. Aerobic granular sludge in an SBR-system trating wastewater rich in particulate matter. **Water Science & Technology**, v.49, p.41-46, Aug. 2004.

SEVIOUR, T. *et al*. Understanding the properties of aerobic sludge granules as hydrogels. **Biotechnology and bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1483-1493, 2009.

SHIELDS-MENARD, S. A. *et al*. A review on microbial lipids as a potential biofuel. **Bioresource technology**, v. 259, p. 451-460, 2018.

SHOW, K. Y.; LEE, D. J.; TAY, J. H. Aerobic granulation: Advances and challenges. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1622–1640, 2012.

SONG, Biyu; CHEN, Xiaofei. Effect of Aeolosoma hemprichi on excess activated sludge reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 162, n. 1, p. 300-304, 2009.

TANG, C. C. *et al.* Effect of aeration rate on performance and stability of algal-bacterial symbiosis system to treat domestic wastewater in sequencing batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 156–164, 2016.

TAO, Q. *et al*. Enhanced biomass / biofuel production and nutrient removal in an algal bio fi lm airlift photobioreactor**. Algal research**. v. 21, p. 9–15, 2017.

UMMALYMA, S. B. *et al.* Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 227–235, 2017.

VAN DER HOEK, Jan Peter; DE FOOIJ, Heleen; STRUKER, André. Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam's wastewater. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 113, p. 53-64, 2016.

VAN HAANDEL, Adrianus; VAN DER LUBBE, Jeroen**. Handbook biological waste water treatment-design and optimisation of activated sludge systems**. Webshop Wastewater Handbook, 2007.

VAN LOOSDRECHT, Mark CM; BRDJANOVIC, Damir. Anticipating the next century of wastewater treatment. **Science**, v. 344, n. 6191, p. 1452-1453, 2014.

WANG, S. *et al*. Function of quorum sensing and cell signaling in the formation of aerobic granular sludge. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.

WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

YAN, Jin-Lei; CUI, You-Wei; HUANG, Ji-Lin. Continuous flow reactors for cultivating aerobic granular sludge: configuration innovation, principle and research prospect. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2021.

YANG, Ya-Chun *et al*. Accelerated aerobic granulation using alternating feed loadings: Alginate-like exopolysaccharides. **Bioresource technology**, v. 171, p. 360-366, 2014.
YELLAPU, S. K *et al*. Recent developments of downstream processing for microbial lipids and conversion to biodiesel. **Bioresource technology**, v. 256, p. 515-528, 2018.

YONG, J. J. J. Y. *et al.* Prospects and development of algal-bacterial biotechnology in environmental management and protection. **Biotechnology advances**, v. 47, p. 107684, 2021.

ZHANG, D. *et al*. Aerobic granulation accelerated by biochar for the treatment of refractory wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 314, p. 88–97, 2017.

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

ZHANG, Meng; JI, Bin; LIU, Yu. Microalgal-bacterial granular sludge process: A game changer of future municipal wastewater treatment?. **Science of The Total Environment**, v. 752, p. 141957, 2021.

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

ZHANG, Shaoxiong; HUO, Huanchen; MENG, Fansheng. Partial Nitrification Algal-Bacterial Granule System Cultivation: Performance, Lipid Production and Biological Community. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 231, n. 5, p. 1-10, 2020.

ZHANG, Y. *et al*. Knowledge based domain adaptation for semantic segmentation. **Knowledge-Based Systems**, v. 193, p. 105444, 2020.

ZHAO, L. *et al.* Comparative study of aerobic granular sludge with different carbon sources: Effluent nitrogen forms and microbial community. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, p. 102211, 2021.

ZHAO, T. *et al*. Isolation and characterization of a strain with high microbial attachment in aerobic granular sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 106, p. 194-203, 2021.