LINA SUSANA PÉREZ MORA

**Uso de micro-organismos fotossintetizantes para remoção de nutrientes
residuais de águas provenientes de tratamento aeróbio de esgoto**

São Paulo

2019

LINA SUSANA PÉREZ MORA

**Uso de micro-organismos fotossintetizantes para remoção de nutrientes
residuais de águas provenientes de tratamento aeróbio de esgoto**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração:
Tecnologia de Fermentações

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Co-orientadora:
Profa. Dra. Célia Leite Sant'Anna

São Paulo
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P438u Pérez-Mora, Lina Susana
Uso de micro-organismos fotossintetizantes para
remoção de nutrientes residuais de águas
provenientes de tratamento aeróbio de esgoto / Lina
Susana Pérez-Mora. - São Paulo, 2019.
85 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de
Coorientador: Sant'Anna, Celia Leite

1. Biotecnologia microbiana: Bioquímica industrial. 2.
Tratamento terciário de efluente. 3. Biotecnologia.
4. Microalgas. 5. Bioquímica microbiana. I. T. II.
Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador. III.
Sant'Anna, Celia Leite, coorientador.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por bendecirme en esta experiencia, por llevarme siempre en sus brazos, por las enseñanzas y porque hizo realidad este sueño.

Al profesor João Carlos Monteiro de Carvalho, quien me enseñó a crecer y a formarme. Gracias por el esfuerzo, la dedicación, la paciencia, la confianza y la motivación en todo momento. Gracias por la tranquilidad transmitida en los momentos difíciles. Gracias por nunca desistir y darme fortaleza cuando fue necesario. “Tudo vai dar certo”.

A la profesora Célia Leite Sant’Anna, por transmitirme sus conocimientos en Taxonomía, por la paciencia, la confianza y por aceptar ser mi Co-orientadora.

A CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil) por el apoyo financiero a través de la beca otorgada.

A la empresa y a las personas que se disponibilizaron para providenciar el agua residual después del tratamiento aeróbico.

A mis papás. Gracias por acompañarme, apoyarme en todo momento y en cualquier lugar. Gracias por la motivación y creer en mí. Gracias a ustedes cumpla una etapa más en el camino de mi vida.

A mi hermano Sebastián, que aún estando lejos podía tener esas palabras de alivio en los momentos justos y necesarios. Gracias por estar siempre presente.

A mi hermano Jairo, mis abuelos, mi tía Zully, las personas a las cuales llevo siempre en mi corazón y en mis recuerdos. Quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todas sus bendiciones.

A mi perro, llamado Lucas, por haber sido parte de mi vida. Gracias por los momentos de felicidad con tu presencia.

A mi ahijado, gracias por tu cariño, por tu inocencia que hizo que mi corazón latiera fuerte y me llenara de felicidad.

A Adriana por apoyarme desde lejos, por escucharme, y por dejarme vivir la experiencia de ser madrina.

A mi familia en general, que siempre estaba pendiente de mí, apoyándome y mandándome buenos deseos.

A Marcelo y a Lauris, gracias por el apoyo incondicional, por la paciencia, la compañía en los momentos difíciles y el ánimo a través de estos 7 años.

A Evellin, gracias por el apoyo y por los momentos compartidos en el laboratorio.

A Luisa mi compañera de lucha, gracias por siempre tener palabras de alivio y ánimo. Gracias por siempre estar ahí aunque a unos cuantos km de distancia.

A Marcela y Roger, gracias por el apoyo y las grandes conversaciones.

A Victor, gracias por sostener mi fé en los momentos que llegue a perderla.

A Luisa, gracias por la fortaleza y los cuidados.

A mis amigos de alma libre Ignacio y Alberto, gracias por las múltiples enseñanzas.

A Eduardo, gracias por respetar mis momentos y mis tiempos, por los consejos y las horas de conversaciones.

A Alirio, gracias por las horas compartidas. Siempre disfrute de las grandes charlas.

A Vi, gracias por la compañía y las horas de entonar algunas canciones.

A todos los que han compartido conmigo en estos 8 años en Brasil Elisângela, Dica, Claus, Rosmery, Ángela, César, Carlos, Larissa, Karina, Thiago, Juan Carlos, João, Ivan, Tais, Rogerio, Alex, Johanna, Mauricio, Josemir, Rubén.

A mis amigos de Colombia Moni, Daniel, Julianita, Juanda por darme apoyo a unos kilometros de distancia.

A la Sra Maritza, Sra Leyda, Sandra y Valeria, gracias por el apoyo incondicional y acompañarme de corazón.

A la Sra Lu, gracias por darle ese cariño a mi casa, que me permitia disfrutar de tranquilidad y descanso.

Y finalmente, a todos los que directa o indirectamente contribuyeron para la realización de este trabajo.

RESUMO

PÉREZ-MORA; L.S. **Uso de micro-organismos fotossintetizantes para remoção de nutrientes residuais de águas provenientes de tratamento aeróbio de esgoto.** 2019. 85 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

O cultivo de micro-organismos fotossintetizantes em efluente secundário, proveniente de tratamento de esgoto doméstico, permite a remoção de nutrientes deste, diminuindo a eutrofização em corpos hídricos. Este trabalho visa ao crescimento de microalgas em água residuária de tratamento aeróbico de esgoto para redução de nitrogênio e fósforo desta. Foram realizados cultivos de *Chlorella vulgaris* e *Monoraphidium contortum* isolados de mangue em Erlenmeyers e em fotobiorreator com uso de águas residuárias sem adição de glicose e com adições de 30 mg.L⁻¹ ou 70 mg.L⁻¹ deste, bem como em meio padrão Bold. A adição de glicose nas águas residuárias nas concentrações de 30 e 70 mg.L⁻¹, de um modo geral, favoreceu o crescimento celular de *C.vulgaris* em Erlenmeyers. Nos cultivos de *M. contortum* em Erlenmeyers não ocorreu aumento da concentração celular máxima (X_m) com a adição de glicose, mas as produtividades em células aumentaram em decorrência dos menores tempos de cultivo. O meio Bold levou a maiores tempos de cultivo que as águas residuárias. A microalga *M. contortum* cresceu mais que a *C. vulgaris*, independentemente do tipo de condição de cultivo, mas a maior diferença ocorreu em Erlenmeyers. Os valores de X_m em fotobiorreator com uso de água residuária para *C. vulgaris* e *M. contortum* foram de 3,55x10⁷ células.ml⁻¹ e 5,61x10⁷ células ml⁻¹, respectivamente, com adição de 70 mg.L⁻¹ de glicose na água residuária. Os cultivos em co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residual sem adição de glicose resultaram em parâmetros de crescimento intermediários aos obtidos para as monoculturas. Em todos os cultivos com microalgas foi possível a depuração de fosfato e nitrato do meio de cultivo, seja o meio Bold ou a água residuária, com porcentagens de remoção destes nutrientes de até 99%. Em todos os cultivos também ocorreu diminuição do valor de demanda química de oxigênio das águas residuárias utilizadas para o crescimento das microalgas. Os teores de lipídios de *C.vulgaris* e *M. contortum* em fotobiorretor não sofreram grandes variações frente às condições experimentais e apresentaram valores médios de 26,2% e 39,9%, respectivamente. Os teores de proteínas médios de *C. vulgaris* e *M. contortum* em fotobiorreatores tubulares foram de 16,6% e 17,3%, respectivamente.

ABSTRACT

PÉREZ-MORA; L.S. **Use of photosynthesizing microorganisms for the removal of residual nutrients from wastewater from aerobic treatment of sewage.** 2019. 85 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2019.

The cultivation of photosynthetic microorganisms in secondary effluent from domestic sewage treatment allows the removal of nutrients from it, reducing eutrophication in water bodies. This project aims at the growth of microalgae in aerobic sewage wastewater for its nitrogen and phosphorus reduction. *Chlorella vulgaris* and *Monoraphidium contortum* isolated from mangrove were cultivated in Erlenmeyers and photobioreactor using glucose-free wastewater and this effluent with 30 mg.L⁻¹ or 70 mg.L⁻¹ of glucose, as well as Bold standard medium. The addition of glucose in wastewater at concentrations of 30 and 70 mg.L⁻¹ generally favored cell growth of *C. vulgaris* in Erlenmeyers. In *M. contortum* cultures in Erlenmeyer, there was no increase in maximum cell concentration (X_m) with the addition of glucose, but cell productivities increased due to shorter cultivation times. The Bold medium led to longer cultivation times than wastewater. Microalgae *M. contortum* grew faster than *C. vulgaris*, regardless of the type of cultivation condition, but the biggest difference occurred in Erlenmeyers. X_m values in a photobioreactor using wastewater for *C. vulgaris* and *M. contortum* were 3.55x10⁷ cells.ml⁻¹ and 5.61x10⁷ cells.ml⁻¹, respectively, with 70 mg.L⁻¹ of glucose in the wastewater. Cultivations in co-culture of *C. vulgaris* and *M. contortum* in wastewater without addition of glucose resulted in intermediate growth parameters if compared to those obtained in monocultures. In all microalgae cultures, it was possible to remove phosphate and nitrate from the culture medium, either from Bold medium or from the wastewater, with percentages of removal of these nutrients up to 99%. In all cultivations, there was also a decrease in the chemical oxygen demand of the wastewater used for microalgae growth. The lipid contents of *C. vulgaris* and *M. contortum* in photobioreactor did not vary significantly under the experimental conditions and presented average values of 26.2% and 39.9%, respectively. The average protein contents of *C. vulgaris* and *M. contortum* in tubular photobioreactors were 16.6% and 17.3%, respectively.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema geral fotobiorreator aberto.....	29
Figura 2 – Esquema geral fotobiorreator fechado.	30
Figura 3 – Esquema do fotobiorreator: (1) sistema airlift; (2) sistema de amostragem; (3) tubo de silicone externo; (4) frasco degaseificador com agitação por turbina de Rushton; (5) tubos de vidro; (6) lâmpadas fluorescentes de 20W; (7) sistema de saída de ar; (8) membrana de 0,22 µm para adição de glicose; (9) sistema de pH; (10) sistema de CO ₂ ; (11) esfera de nylon. “M” no esquema corresponde ao motor para a agitação no frasco degaseificador.	42
Figura 4 – Curva calibração do teor de nitrato (NO ₃ ⁻)	44
Figura 5 – Curva calibração do teor de nitrito	45
Figura 6 – Curva calibração do teor de amônio	46
Figura 7 – Curva calibração do teor de fósforo	47
Figura 8 – Curva para determinação da demanda química de oxigênio (DQO) nas fases aquosas das águas residuárias	48
Figura 9 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com <i>C. vulgaris</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	51
Figura 10 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com <i>M. contortum</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	55
Figura 11 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em água residuária sem adição de glicose	57
Figura 12 – Proporção entre células de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em função do tempo em cultivo em Erlenmeyers em água residuária sem adição de glicose	58
Figura 13 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>C. vulgaris</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose	

(Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	61
Figura 14 – Concentração de fosfato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>C. vulgaris</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	63
Figura 15 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>C. vulgaris</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■). Nos instantes 6 e 7 dias o valor de nitrato para o meio Bold foi abaixo do limite de detecção do método empregado para sua análise	63
Figura 16 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>C. vulgaris</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	64
Figura 17 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>M. contortum</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ (○) e 70 mg.L ⁻¹ (■)	66
Figura 18 – Concentração de fosfato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>M. contortum</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ e 70 mg.L ⁻¹ (■)	67
Figura 19 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>M. contortum</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ e 70 mg.L ⁻¹ (■)	68
Figura 20 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com <i>M. contortum</i> em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L ⁻¹ e 70 mg.L ⁻¹ (■)	68
Figura 21 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em água residuária sem adição de glicose	70

Figura 22 – Proporção entre células de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em função do tempo em cultivo em fotobiorreator em água residuária sem adição de glicose	70
Figura 23 – Concentração de fostato em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em água residuária sem adição de glicose	71
Figura 24 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em água residuária sem adição de glicose	72
Figura 25 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i> em água residuária sem adição de glicose	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Experimentos realizados em Erlenmeyers	40
Tabela 2 – Experimentos realizados em fotobiorreatores	41
Tabela 3 – Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) e valores finais de pH obtidos nos cultivos de <i>C. vulgaris</i> em Erlenmeyers	52
Tabela 4 – Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) e valores finais de pH obtidos nos cultivos de <i>M. contortum</i> em Erlenmeyers	55
Tabela 5 – Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) obtidos nos cultivos de <i>C. vulgaris</i> em fotobiorreator	62
Tabela 6 –Valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de <i>C. vulgaris</i> em fotobiorreator.....	65
Tabela 7 - Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) obtidos nos cultivos de <i>M. contortum</i> em fotobiorreator	66
Tabela 8 –Valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de <i>M. contortum</i> em fotobiorreator	69
Tabela 9 – Resultados de composição centesimal das biomassas obtidas nos cultivos em fotobiorreator tubular sob diferentes condições experimentais	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Condutividade Elétrica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
STD	Sólidos Totais Dissolvidos
VVM	Volume de ar por volume de meio por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolos Latinos

x	Concentração celular (mg.L ⁻¹)
$X_{m\acute{a}x}$	Concentração celular máxima (mg.L ⁻¹)
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica de crescimento máxima (d ⁻¹)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS.....	14
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Revisão de literatura.....	19
1.1.1 Água residual.....	19
1.1.2 Tratamento água residual proveniente de esgoto.....	21
1.1.3 Eutrofização.....	21
1.1.4 Reutilização da água	22
1.1.5 Tratamento terciário.....	23
1.1.6 Crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em água residual.....	26
1.1.7 Dispositivo de cultura.....	27
1.1.8 Métodos para recolher a biomassa	31
1.1.8.1 Filtração	31
1.1.8.2 Centrifugação	32
1.1.8.3 Sedimentação	32
1.1.8.4 Floculação	33
1.1.8.5 Flotação	34
1.1.9 Usos da biomassa	34
1.1.10 Análise de custo-benefício.....	36
1.1.11 Reutilização da água após tratamento terciário.....	36
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral.....	38
2.2 Especificos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Micro-organismos e manutenção	39
3.2 Água residuária.....	39

3.3	Experimentos realizados	39
3.3.1	Cultivos em Erlenmeyers.....	39
3.3.2	Cultivos em Fotobiorreator tubular	40
3.4	Técnicas analíticas	42
3.4.1	Medidas utilizadas para o acompanhamento dos experimentos.....	43
3.4.1.1	Determinação da concentração celular	43
3.4.1.2	Determinação do valor de pH	43
3.4.1.3	Determinação de nutrientes	43
3.4.1.4	Determinação do teor de nitrato (NO₃⁻) Protocolo 4500 (NO₃⁻) A e B: APHA, 2000:.....	44
3.4.1.5	Determinação do teor de nitrito: MACKERETH et. al., 1978/ CARMOUZE, 1994:	44
3.4.1.6	Determinação do teor de amônio: KOROLEFF, 1976 / CARMOUZE, 1994:	45
3.4.1.7	Determinação do teor de fosfato: STRICKLAND; PARSONS, 1965 /CARMOUZE, 1994:	46
3.4.1.8	Determinação de DQO.....	47
3.4.2	Análise da Biomassa.....	48
3.5	Análise dos resultados	50
4	RESULTADOS E DISCUSÃO	50
4.1	Cultivo das microalgas em Erlenmeyers	50
4.1.1	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	50
4.1.2	Cultivo de <i>Monoraphidium contortum</i>	53
4.1.3	Cultivo de co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i>	55
4.2	Cultivo das microalgas em fotobiorreator.....	58
4.2.1	Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	60
4.2.1.1	Avaliação do crescimento celular	60
4.2.1.2	Avaliação da remoção de nutrientes e DQO.....	62
4.2.2	Cultivo de <i>Monoraphidium contortum</i>	65
4.2.2.1	Avaliação do crescimento celular	65

4.2.2.2	Avaliação da remoção de nutrientes e DQO.....	66
4.2.3	Cultivo de co-cultura de <i>C. vulgaris</i> e <i>M. contortum</i>	69
4.2.3.1	Avaliação do crescimento celular	69
4.2.3.2	Avaliação da remoção de nutrientes e DQO.....	71
4.2.4	Avaliação da composição centesimal das biomassas obtidas em cultivos em fotobiorreator tubular.....	73
4.2.5	Análise estatístico	76
5	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população urbana, especialmente a crescente urbanização em áreas com escassez de água, a poluição dos corpos de águas superficiais e subterrâneas, a distribuição irregular de recursos hídricos e severos períodos secos, têm como resultado uma demanda crescente da água para atender às necessidades domésticas, comerciais, industriais e agrícolas, contribuindo para o esgotamento de fontes de água doce. As autoridades governamentais, bem como os dirigentes de serviços públicos, deparam-se com o desafio de aumentar o abastecimento de água e, simultaneamente, proteger o meio ambiente, bem como fortalecer as economias regionais, tribais e locais, fornecendo água para uma crescente base de clientes, o que leva à procura de novas estratégias para o gerenciamento dos recursos hídricos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004; SILVA; TORRES; MADERA, 2008). A crescente demanda por água faz com que seja necessário encontrar novas formas de ampliar a vida dos recursos hídricos, e gerenciá-los de forma sustentável. Na demanda de água, o reuso tem um papel importante, mas, é necessário analisar o estado atual do corpo hídrico no planejamento, a conservação dos recursos, e conhecer como pode ser afetada a saúde humana (WIENER; JAFVERT; NIES, 2016).

Os seres humanos alteram o ciclo da água para a produção de alimentos, fabricação, produção de energia, fornecimento de água potável e recreação (WIENER; JAFVERT; NIES, 2016). Portanto, quando a demanda excede a capacidade da fonte mais pura, e fontes adicionais estão indisponíveis ou disponíveis somente a um custo alto, água de qualidade inferior pode ser usada para substituir os propósitos não potáveis. Em muitos casos, águas residuais tratadas podem representar um substituto mais econômico e/ou disponível para usos como irrigação de gramados, parques, fronteiras rodoviárias, refrigeração industrial, lavagem de gases, processamento industrial, autoclismos, controle de poeira e construção, limpeza e manutenção, incluindo a lavagem de veículos, fontes cênicas, bem como propósitos ambientais e recreativos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004). Grande quantidade de água residual de tratamento de efluentes orgânicos, incluindo água de tratamento de esgoto doméstico, após passar por tratamento secundário é lançada em corpos hídricos quando se atinge os limites exigidos pela legislação quanto à redução de matéria orgânica. No entanto, essas águas residuárias ainda podem conter valores residuais de fósforo e nitrogênio que irão para os corpos hídricos, podendo contribuir para o aumento dos níveis destes nutrientes nestas águas e,

consequentemente, contribuir para que possa ocorrer fenômenos de eutrofização. Assim, no presente trabalho, apresenta-se a avaliação do emprego de microalgas no tratamento terciário de água proveniente de tratamento secundário de esgoto doméstico.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Água residual

As águas residuais que chegam à estação de tratamento são provenientes de três fontes principais: esgoto doméstico (banheiro, cozinha, lavanderia), infiltração e efluentes industriais (ERIKSSON et al., 2002; VON SPERLING, 2007). A composição de águas residuais depende da fonte, já que varia significativamente dependendo do estilo de vida, costumes, substâncias descarregadas etc. Além disso, alguns destes compostos sofrem degradação química e biológica na tubulação ou durante o armazenamento (ERIKSSON et al., 2002). Sendo assim, as fontes devem ser caracterizadas em termos de qualidade e quantidade (VON SPERLING, 2007).

Segundo dados do Censo 2010, divulgados pelo IBGE, o saneamento básico é a maior carência do Brasil na área de serviços públicos e infraestrutura: nesta avaliação, apenas 55,4% dos 57,3 milhões de domicílios estão ligados à rede geral de esgoto, outros 11,6% utilizam fossa séptica e os demais 32,9% não têm saneamento básico, estando nessa situação 18,9 milhões de domicílios brasileiros. O saneamento básico é constituído pelos serviços de abastecimento de água, coleta e tratamento de esgotos, coleta da drenagem pluvial, e coleta de lixo, sendo condição fundamental para a saúde pública. Este está diretamente associado aos problemas de poluição e/ou contaminação dos recursos hídricos e do solo, pois a deficiência de saneamento básico gera a disposição inadequada de esgotos, contaminando/poluindo os rios e córregos, além de favorecer a proliferação de vetores de doenças (nos lixões, por exemplo) (TRATA BRASIL, 2015). Em avaliação recente, 42,67% dos esgotos do país são tratados, e na região sudeste a porcentagem de esgoto tratado é de 47,39% (TRATA BRASIL, 2016).

Características físicas, químicas e biológicas definem a qualidade das águas residuais (ERIKSSON et al., 2002; VON SPERLING; DE LEMOS CHERNICHARO, 2005). As águas residuais domésticas contêm aproximadamente 99,9% de água, e os 0,1% restantes são

representados por compostos orgânicos e inorgânicos, sólidos suspensos e dissolvidos e micro-organismos (VON SPERLING, 2007).

Entre os parâmetros físicos se incluem a temperatura (dependendo das estações do ano), cor (aparência preta devido a reações biológicas), odor (impurezas dissolvidas) e turbidez. A temperatura é um parâmetro muito importante, pois influencia a atividade microbiana, a solubilidade dos gases e a viscosidade do líquido (VON SPERLING, 2007). A alta temperatura também pode afetar outros parâmetros, como pH, condutividade, saturação de gás, alcalinidade, etc. (ERIKSSON et al., 2002; RAWAT et al., 2011).

Entre as características químicas estão sólidos suspensos ou dissolvidos (orgânicos e inorgânicos), compostos minerais, matéria orgânica (mistura heterogênea de diversos compostos orgânicos), demanda bioquímica de oxigênio (DBO: fração biodegradável de compostos orgânicos), demanda química de oxigênio (DQO: quantidade de oxigênio total para oxidar os compostos orgânicos) e alcalinidade (capacidade tamponante do meio) (PISAREVSKY; POLOZOVA; HOCKRIDGE, 2005; VON SPERLING, 2007). Os principais componentes das águas residuais são proteínas, carboidratos, lipídios, uréia e baixas concentrações de compostos orgânicos sintéticos. Os componentes inorgânicos encontrados incluem: cloreto, íons de hidrogênio, nitrogênio, fósforo, enxofre e alguns metais pesados (MUTTAMARA, 1996). Entre os compostos xenobióticos orgânicos encontrados estão: detergentes, sabões, perfumes, conservantes etc. que são resultantes do uso de substâncias químicas em indústrias e residências. As características químicas como alcalinidade, dureza e pH da água determinam a capacidade de tamponamento (ERIKSSON et al., 2002).

As medidas de turbidez e sólidos suspensos permitem obter informações sobre partículas ou colóides que podem gerar obstruções de instalações ou filtros. A combinação de colóides e surfactantes (detergentes) pode causar a estabilização da fase sólida, o que pode reduzir a eficiência no pré-tratamento (assentamento de matéria sólida). DBO e DQO permitem conhecer o risco de depleção de oxigênio devido à degradação da matéria orgânica durante o transporte e armazenamento (ERIKSSON et al., 2002).

As águas residuais, em suas características biológicas, contêm diferentes tipos de macro-organismos e micro-organismos. A eficácia do tratamento de águas residuais depende da concentração das espécies necessárias para o tratamento (RAWAT et al., 2011). Os micro-

organismos presentes nas águas residuais são: bactérias (estabilizam matéria orgânica), archaea, algas, fungos, protozoários, helmintos e vírus (VON SPERLING, 2007). A matéria orgânica contida nas águas residuais é decomposta por bactérias aeróbicas, gerando dióxido de carbono, amônia, fosfato etc. Esses produtos são utilizados pelas algas, liberando oxigênio, que é utilizado pelas bactérias para oxidar os resíduos adicionais (OSWALD, 1962). A maior parte do lixo orgânico é complexo e sua natureza química não permite que ele esteja disponível para as algas, por isso é necessário incluir bactérias para decompor compostos complexos em substâncias simples para as algas (OSWALD; GOLUEKE, 1966).

1.1.2 Tratamento água residual proveniente de esgoto

O tratamento de esgoto pode ser dividido em aeróbios e anaeróbios. No tratamento aeróbio, a matéria orgânica solúvel é oxidada por um processo de respiração, levando à formação de gás carbônico e grande quantidade de lodo. Nos processos anaeróbios, por sua vez, a degradação da matéria orgânica solúvel e insolúvel é realizada por dois grupos de micro-organismos. As bactérias acidificantes são responsáveis pela conversão da matéria orgânica em ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, e as bactérias metanogênicas são responsáveis pela conversão do ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono em gás metano (GRADY et al., 2011).

Processos aeróbicos para o tratamento de águas residuárias eliminam os compostos orgânicos solúveis em menor tempo do que no processo anaeróbio, sendo de vital importância os processos aeróbicos para reduzir os resíduos transportados pela água (OSWALD, 1962).

1.1.3 Eutrofização

A remoção de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) é uma exigência em um tratamento básico de efluentes para a obtenção de padrões aceitáveis para sua liberação em corpos d'água, evitando assim, o processo de eutrofização. De fato, a liberação destes nutrientes em corpos hídricos pode ter como consequência o crescimento excessivo de plantas aquáticas ou algas, perturbando o equilíbrio do ecossistema pela anoxia (ausência de oxigênio), turbidez (aumento) ou perda de habitat e biodiversidade (VON SPERLING; DE LEMOS CHERNICHARO, 2005; ARBIB et al., 2014; SAHOO; SECKBACH, 2015). Portanto, é necessário analisar o estado atual dos corpos hídricos para planejar a conservação dos recursos

e saber como a saúde humana pode ser afetada (WIENER; JAFVERT; NIES, 2016). Além disso, especial atenção deve ser dada ao tratamento de águas residuárias para redução de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo (VON SPERLING; DE LEMOS CHERNICHARO, 2005; RASOUL-AMINI et al., 2014), a fim de permitir, em um estágio posterior, a reutilização de água para fins não potáveis.

1.1.4 Reutilização da água

A reutilização da água oferece o potencial para explorar um recurso (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004) e é cada vez mais reconhecida como uma estratégia de gestão sustentável da água, levando em conta a estabilidade, confiabilidade, economia e distribuição para atender às diferentes necessidades dos usuários (CHEN et al., 2017), sendo importante principalmente quando o suprimento de água disponível é comprometido e não é possível suprir as crescentes demandas de água na comunidade em crescimento. A água recuperada pode ser apropriada para muitas aplicações não potáveis, como resfriamento industrial, água de limpeza e irrigação. A reutilização da água também ajuda a proteger o meio ambiente, reduzindo a quantidade de efluente tratado liberado para corpos de água (ASANO et al., 2007).

Com o objetivo de melhorar a qualidade da água que é descarregada nos corpos de água, existem algumas estratégias (lagoa aerada, filtros biológicos, contadores biológicos rotativos, lagoa de estabilização, digestão anaeróbica, etc.) para remover os nutrientes das águas residuais (RAWAT et al., 2011). No entanto, esses processos podem ser muito caros e produzir grande quantidade de lodo (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010). Chudoba (1985), classificou em 3 categorias os compostos orgânicos produzidos pelos micro-organismos no tratamento de efluentes. i) compostos excretados pela interação do meio ambiente e micro-organismos, ii) compostos originados pelo metabolismo microbiano sobre o substrato; e iii) compostos que são liberados pela degradação e lise de micro-organismos.

Este problema global pode ser resolvido com o cultivo de microalgas em efluentes secundários de estações de tratamento de esgoto para remover os nutrientes extras presentes em águas residuais, com a produção de biomassa de valor comercial, além da biofixação de dióxido de carbono (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA; STEPHENSON, 2010; RAWAT et al., 2011; ARBIB et al., 2013; COLE et al., 2016). Este processo contribuiria com produção de

produtos valiosos, além de evitar a descarga direta de materiais para o meio ambiente (NEVEUX et al., 2016), onde a sustentabilidade ambiental é caracterizada por dois grandes desafios: águas residuais e gases de efeito estufa (ARBIB et al., 2014). Além disso, traz a vantagem do custo de tratamento ser compensado pela produção de insumo de interesse econômico (SYDNEY et al., 2011).

A biorremediação com o uso de algas eucarióticas (microalgas ou algas) ou cianobactérias procarióticas é chamada fitorremediação, caracterizada pela remoção de nutrientes ou outros componentes tóxicos, como metais pesados e contaminantes orgânicos (SAHOO; SECKBACH, 2015).

Sabendo-se que os diferentes efluentes provenientes das estações de tratamento têm propriedades físico-químicas diversas, segundo certas condições operacionais, pode ser realizado o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes para realizar um tratamento terciário da água residual (HEREDIA-ARROYO et al., 2011).

1.1.5 Tratamento terciário

A remoção de nutrientes por micro-organismos fotossintetizantes oferece uma série de vantagens do ponto de vista industrial (bio-fixação de dióxido de carbono; produção de biomassa e bio-produtos), com um aumento do interesse comercial na biotecnologia de micro-organismos fotossintetizantes (IMAN SHAYAN et al., 2016). No entanto, algumas considerações devem ser levadas em conta: a) as concentrações de nutrientes são diferentes em cada efluente; b) pode haver a necessidade de remover apenas um nutriente que esteja em excesso e, neste caso, a adição do outro componente em águas residuais pode ser necessária para equilibrar a proporção de nutrientes de modo que não haja limitação no crescimento celular (BLANK; PARKS; HINMAN, 2016).

Os nutrientes encontrados na água residual são substâncias necessárias e essenciais para otimizar o crescimento dos micro-organismos. Além do carbono, o nitrogênio e o fósforo são os nutrientes mais importantes para o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes. Concentrações de nitrogênio total e fósforo total em águas residuárias diferem significativamente dependendo do tipo de esgoto (CHIU et al., 2015). Na maioria dos casos, a presença de nitrogênio e fósforo nas águas residuais significa que estas podem ser usadas para

o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes. No entanto, algumas águas residuais com altas concentrações de nutrientes podem ter baixo crescimento ou, ao contrário, águas residuais com baixas concentrações de nutrientes podem ter crescimentos intensos de algas (OSWALD; GOLUEKE, 1966).

Os micro-organismos fotossintetizantes podem assimilar nitrogênio orgânico na forma de uréia ou aminoácidos (FLORES; HERRERO, 2005) e, pelo metabolismo mixotrófico, podem assimilar carbono na forma de compostos orgânicos. De fato, Matsudo et al. (2014) e Matsudo et al. (2017), mostraram que a cianobactéria *Arthrospira platensis* e a microalga verde *Scenedesmus obliquus* tiveram seu crescimento aumentado pela adição de acetato e etanol, respectivamente, no meio de cultura.

No efluente com tratamento secundário, a maior parte do nitrogênio está presente na forma de amônio, mas alguns processos são concebidos para atingir a nitrificação e o efluente irá então conter principalmente nitrato. Os efluentes de esgoto também podem conter de 5 a 50 mg.L⁻¹ de fósforo, dependendo da dieta e uso de água da população local. Em solos calcários e pH alcalino, o fósforo se precipita na forma de fosfato de cálcio. No entanto, em solos ácidos, o fosfato reage com os óxidos de ferro e de alumínio no solo para formar outros compostos insolúveis (PESCOD, 1992).

O efluente de esgoto contém concentrações de ferro ≤ 3 mg.L⁻¹ e manganês $\leq 0,15$ mg.L⁻¹ (HAMEED et al., 2016), além de um amplo espectro de outros produtos químicos em baixas concentrações. Os oligoelementos de maior preocupação em níveis elevados são cádmio, cobre, molibdênio, níquel e zinco (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004). Uma gestão inadequada da irrigação com águas residuais pode representar riscos substanciais à saúde pública e ao ambiente, devido aos seus componentes microbianos e tóxicos (ELGALLAL; FLETCHER; EVANS, 2016). O níquel e o zinco têm efeitos adversos visíveis em plantas em concentrações mais baixas do que os níveis nocivos para animais e seres humanos. Cádmio, cobre e molibdênio, no entanto, podem ser prejudiciais para os animais em concentrações demasiadamente baixas para impactar plantas (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004).

Um exemplo das características da água residual de esgoto municipal pode ser observado no estudo realizado por Hameed et al. (2016), produzido a partir do albergue da

Faculdade de Engenharia da Universiti Putra Malaysia (de 336 alunos). Foram encontrados nessa água residual: nitrato, correspondente a $1,88 \text{ mg.L}^{-1}$ de N; nitrito ($0,11 \text{ mg.L}^{-1}$ de N); amônia ($16,3 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de N); fosfato ($6,3 \pm 0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ de P); sólidos suspensos totais ($98 \pm 7,9 \text{ mg.L}^{-1}$); sólidos dissolvidos (205 mg.L^{-1}); pH de 7,15 a 7,90 a uma temperatura de $27 - 29^\circ\text{C}$.

Geralmente, as microalgas têm a seguinte composição elementar química aproximada: $\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$. Fontes de carbono e nitrogênio geralmente provienem do dióxido de carbono e do NH_4^+ e as fontes de O_2 e H^+ são ministradas a partir da água (OSWALD, 1991).

McGinn et al. (2011) relataram que durante o crescimento balanceado de microalgas, as proporções elementares de C: N: P da biomassa de microalgas assumem, em termos molares, proporções previsíveis de 106:16:1, chamadas de estequiometria de Redfield, embora possam ocorrer desvios nesta proporção. Quando o crescimento se torna limitado por apenas um nutriente, a absorção dos outros diminuirá levando à correspondente acumulação no ambiente extracelular. Adicionalmente, Wang et al. (2010a) indicam que a razão massa N: P na faixa de 6,8-10,0 é a ideal para produção de microalgas. Eles concluíram que o resíduo líquido resultante da centrifugação do lodo é a melhor fração de efluente nas estações de tratamento para atingir altos valores de produtividade de microalgas, permitindo assim uma alta porcentagem de eliminação de nutrientes. Eles também observaram que as microalgas foram eficientes para a remoção de metais dissolvidos (Al, Ca, Fe, Mg e Mn) nas águas residuais do tratamento secundário. De fato, microalgas como *Chlorella vulgaris*, por exemplo, têm a capacidade de adsorver metais pesados (RODRIGUES et al., 2012), o que poderia ser útil em estações de tratamento de efluentes (ETEs), já que mesmo nos metais de esgoto podem estar presentes (WANG et al., 2005).

Os micro-organismos fotossintetizantes assimilam o nitrogênio inorgânico na forma de NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+ , e somente em alguns casos, o N_2 . Mas a forma preferida é o NH_4^+ , uma vez que o NO_3^- e o NO_2^- têm que ser reduzidos a NH_4^+ por serem incorporados pelo sistema enzimático da glutamina sintetase (FLORES; HERRERO, 2005; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). Após a assimilação, o nitrogênio desempenha um papel importante na constituição de biomoléculas como ácidos nucleicos, aminoácidos e pigmentos. O fósforo, por sua vez, é um componente importante dos ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP, e a principal

forma de assimilação pelos micro-organismos fotossintetizantes é o ortofosfato (PO_4^{-3}) (FLORES; HERRERO, 2005; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Além disso, os parâmetros das águas residuais de estações de tratamento de esgoto podem precisar de uma diluição para reduzir a turbidez ou evitar fenômenos de inibição, que podem ocorrer devido à presença de matéria orgânica (WANG et al., 2010b) ou presença de íons (LU et al., 2016). A turvação é causada por matéria suspensa ou impurezas que reduzem a transparência da água e, portanto, limitam a entrada de luz (o que compromete o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes). Essas impurezas podem ser representadas por: argila, lodo, matéria orgânica e inorgânica, compostos orgânicos solúveis coloridos e micro-organismos (WANG et al., 2010b).

1.1.6 Crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em água residual

Os nutrientes são as substâncias necessárias para o crescimento de micro-organismos e dentre os mais importantes para o crescimento de micro-organismos fotossintetizantes são carbono, nitrogênio e fósforo. As concentrações de nitrogênio total e fósforo total das águas residuais diferem significativamente dependendo do tipo de esgoto (CHIU et al., 2015). A água recuperada geralmente contém quantidade suficiente destes nutrientes para suprir as necessidades do crescimento. As microalgas são organismos fotossintetizantes (requerem principalmente luz, água e nutrientes inorgânicos para o crescimento), eucarióticos, unicelulares e relativamente simples em estrutura (XU et al., 2009).

Têm vantagens sobre as plantas em vários aspectos fisiológicos e bioquímicos, por exemplo: suas vias biossintéticas podem ser manipuladas e direcionadas para a produção e acumulação dos compostos necessários (por meio da alteração das condições de cultivo e estresses ambientais); maior eficiência de conversão fotossintética da luz solar (HU et al., 2008); ausência da estrutura de suporte (lignina), que suprime a necessidade de pré-tratamento e reduz os custos industriais (LYND et al., 2008); diversidade genética, ecológica, metabólica e morfológica (LYND et al., 2008).

Estes micro-organismos podem converter dióxido de carbono, derivado do funcionamento de instalações industriais, em biomassa ou uma variedade de compostos derivados desta, como pigmentos, antioxidantes, polissacarídeos e certos compostos bioativos,

com aplicações nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas. A biomassa íntegra ou modificada pode ainda ser usada para alimentação animal, como fertilizantes orgânicos e na geração de eletricidade através da incineração. Adicionalmente, esses micro-organismos podem ser utilizados no tratamento de águas residuais através da remoção de contaminantes como amônia, nitratos e fosfatos (RAJA et al., 2008; XU et al., 2009; SOLOVCHENKO et al., 2016).

Oferecendo uma série de vantagens a partir de uma perspectiva industrial, há um aumento no interesse comercial da biotecnologia de microalgas. A remoção dos nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) na pesquisa de micro-organismos fotossintetizantes é um requisito básico de tratamento terciário de efluentes para se obter padrões aceitáveis para seu lançamento em corpos hídricos. De fato, a utilização de reatores à base de micro-organismos fotossintetizantes aumenta a absorção de nutrientes pela biomassa, que pode ser recuperada a partir do efluente (IMAN SHAYAN et al., 2016). Dependendo da água residuária, pode haver a necessidade de remoção de apenas um nutriente que está em excesso neste resíduo e que é constituinte da biomassa microalgal, que é então recuperada, com a correspondente retirada do nutriente do meio aquoso. Nesse caso, pode ser necessária a adição de outro componente na água residuária para balancear a proporção entre os nutrientes, de modo que não haja limitação de crescimento celular. Por exemplo, Blank; Parks; Hinman (2016), que trabalharam com água residuária de fábrica de celulose e papel, adicionaram quitina como fonte de nitrogênio nesse efluente, do qual se desejava a remoção de fósforo. Ainda com relação à adequação da água residuária para o crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes, em algumas situações, há necessidade de diluição da mesma para evitar fenômenos de inibição, que podem ocorrer devido a presença de matéria orgânica (WANG et al., 2010b), presença de íons (LU et al., 2016), entre outros. Particularmente no caso de águas residuárias de estações de tratamento de esgoto, pode haver necessidade de sua diluição para diminuir a turbidez, que é causada pela matéria em suspensão ou impurezas que diminuem a transparência da água e, portanto, limitam a entrada de luz, necessária no caso de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. Estas impurezas podem ser argila, limo, matéria orgânica e inorgânica, compostos orgânicos coloridos solúveis e micro-organismos (WANG et al., 2010b).

1.1.7 Dispositivo de cultura

Como anteriormente mencionado, para se obter sucesso na remoção de nutrientes, na produção de biomassa e na biofixação de dióxido de carbono, é necessário dar a devida atenção

também à configuração de biorreatores (RAWAT et al., 2011; ARBIB et al., 2013). Existe uma grande variedade de biorreatores usados no cultivo de microalgas (CARVALHO et al., 2014) e, de fato, após estudos bem sucedidos terem sido feitos para tratar a água por micro-organismos fotossintetizantes em escala de laboratório, um dos principais desafios atuais é o aumento de escala para além do laboratório. Particularmente no cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. Grobbelaar (2009), relatou que existem vários problemas em torno disso, atribuindo dificuldades do escalonamento à geometria do fotobiorreator e variáveis ambientais externas de difícil controle, como temperatura e contaminação. Além disso, o processo de recuperação da biomassa requer muito esforço devido à grande quantidade a ser produzida e às concentrações relativamente baixas de micro-organismos fotossintetizantes após o tratamento terciário. De fato, o crescimento final das células é outro campo que merece esforço para ser maximizado, contribuindo para diminuir o custo de separação das células.

Nesse sentido, é imperativo que experimentos em escala de laboratório, seguidos de trabalhos em escala piloto, sejam avaliados sempre que possível para apoiar uma operação em grande escala. Geralmente, os biorreatores de cultura de algas são classificados em sistemas abertos e fechados (TREDICI, 2004).

Fotobiorreatores abertos (Figura 1) são os mais utilizados para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. As lagoas são providas de pás rotativas para permitir a circulação de algas e nutrientes. Eles são relativamente baratos de construir e a operação é fácil (manutenção mínima). No entanto, esse tipo de reator apresenta algumas restrições devido à possibilidade de contaminação (as monoculturas são quase impossíveis) e as condições ambientais são difíceis de serem controladas ao longo do ano; alta taxa de evaporação de água e difusão de dióxido de carbono. Além disso, a densidade celular viável é relativamente baixa, devido aos efeitos de sombreamento (zonas escuras). Consequentemente, áreas extensas de terra para implantação são necessárias (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; RAWAT et al., 2011; ARBIB et al., 2013; TORZILLO; CHINI ZITTELLI, 2015; NEVEUX et al., 2016). Parte das desvantagens deste tipo de fotobiorreator pode ser minimizada, cobrindo-as. Tal procedimento poderia evitar vazão de líquido durante as estações chuvosas e, se coberto adequadamente, tanto a água quanto o CO₂ perdido do tanque poderiam ser recuperados, pelo menos parcialmente, após o tratamento dos gases emitidos do sistema.

Figura 1 – Esquema geral fotobiorreator aberto.

(1) roda de pás; (2) área da lagoa; (3) defletor.

Numerosos estudos mostram vantagens no uso de fotobiorreatores fechados para o cultivo de microalgas, para maximizar a razão superfície/volume, reduzir perda de líquidos por evaporação e gases como CO_2 , propiciar aumento de concentrações celulares, além da possibilitar obtenção de monoculturas. O fotobiorreator tubular é geralmente adotado para o cultivo em larga escala de microalgas autotróficas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011; RAWAT et al., 2011; ARBIB et al., 2013; TORZILLO; CHINI ZITTELLI, 2015). Apesar de suas vantagens, esse tipo de fotobiorreator tem algumas limitações que precisam ser levadas em conta em uma avaliação para uso industrial. São mais caros que os fotobiorreatores abertos, o oxigênio pode ser acumulado no sistema levando a uma possível inibição do crescimento celular e, como consequência da menor evaporação da água, há um significativo aumento de temperatura no meio de cultivo durante o dia, o que precisa ser controlado, evitando uma possível perda da viabilidade da cultura.

O fotobiorreator tubular consiste em uma matriz de tubos transparentes que geralmente são feitos de plástico transparente ou vidro. Esse arranjo tubular (coletor solar) capta a luz solar ou artificial para a fotossíntese. A suspensão de microalgas é continuamente bombeada e distribuída de um reservatório (coluna de degaseificação) para o coletor solar e de volta para o reservatório. O fotobiorreator é normalmente operado continuamente ao longo do período de crescimento microbiano. A coluna de degaseificação é aerada continuamente para remover o

oxigênio acumulado durante a fotossíntese (MIRÓN et al., 2003; CHISTI, 2008; LI; DU; LIU, 2008; ARBIB et al., 2013). O cultivo contínuo é importante em empreendimentos comerciais para determinar a concentração ideal de nutrientes por unidade de tempo em relação à taxa de diluição ou colheita da safra, a fim de evitar o desperdício de recursos. Os TPBR são distribuídos em quatro categorias: serpentina (Figura 2); múltiplo; helicoidal; e arranjo de cercas com fotobiorreatores de coletores (TREDICI, 2004), onde os tubos podem ser posicionados horizontalmente ou verticalmente para máxima captura solar (RAWAT et al., 2011).

Figura 2 – Esquema geral fotobiorreator fechado.

(1) sistema de ar; (2) sistema de amostragem; (3) degaseificador; (4) tubos de vidro.

Um exemplo de cultivo de microalga em sistema fechado foi feito com *Botryococcus braunii* (variedade A), em um fotobiorreator em batelada para tratamento terciário, que mostrou a eliminação de nitrogênio e fósforo, e o acúmulo de componentes na biomassa. A concentração de proteína foi de 12,5% e o total de lipídios foi de 17,85% (ÓRPEZ et al., 2009). Estes valores são inferiores aos adquiridos em biomassa de *Botryococcus braunii* produzidos em meio sintético: 32,1 a 34,1% de proteína e 32,6 a 36,9% de lipídios totais (PÉREZ-MORA et al., 2016).

1.1.8 Métodos para recolher a biomassa

As principais etapas para uma produção efetiva de biomassa são o cultivo, a recuperação e o processamento (SOEDER, 1980). O tratamento terciário de águas residuárias pode ser uma fonte de biomassa de micro-organismos fotossintetizantes, que poderia ser usada como fertilizante e/ou fonte de ácidos graxos para a produção de biodiesel.

Após o cultivo, um fator importante a ter em conta é a recuperação de biomassa, devido ao pequeno tamanho das células (em algumas espécies de algas) e à cultura relativamente diluída em algumas ocasiões ($<0,5 \text{ g.L}^{-1}$ em fotobiorreatores abertos e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ para fotobiorreator tubular) (ARBIB et al., 2013). Portanto, são necessárias técnicas efetivas que permitam o aproveitamento da biomassa da cultura (UMMALYMA et al., 2016), dependendo das características da cultura (RAWAT et al., 2011).

Filtração, centrifugação, sedimentação, floculação (orgânica e inorgânica) e flotação, ou uma combinação dessas operações, são os métodos utilizados para a recuperação de biomassa (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004; RAWAT et al., 2011; ARBIB et al., 2013).

1.1.8.1 Filtração

A filtração é um método para separação sólido-líquido e, em alguns casos, é a primeira operação que ocorre para a recuperação de biomassa. O princípio é reunir biomassa de algas em uma tela de abertura projetada, considerando dimensões das células (SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015). Quando o volume de meio está limitado a pequena escala, um sistema de filtração a vácuo é usado e, dependendo do tamanho das células, microfiltração ou membrana de ultrafiltração podem ser usadas (RAWAT et al., 2011).

Por outro lado, quando o volume representa uma escala maior, filtros de tambor à vácuo rotativos podem ser empregados. Prensa de filtro de câmara também pode ser usada para recuperar microalgas. Estes filtros podem ser usados em operações de vácuo ou pressão, possuindo uma vantagem em processos contínuos onde a esterilidade e contenção não são

severas. O material desses tecidos de filtro pode ser de lona, nylon, dacron, metal ou fibra de vidro (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004).

1.1.8.2 Centrifugação

A centrifugação é outra operação de separação da biomassa, sendo útil em processos em que é necessário manter condições estéreis. Pode ser rápido, eficiente e universal. No entanto, não é economicamente viável em processos de larga escala porque requer altas taxas de energia (RAWAT et al., 2011). A biomassa de algas é separada por uma força gravitacional maior que a força da gravidade (SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015) usando uma centrífuga como um tanque de sedimentação (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004). O sobrenadante é removido por meio de um tubo e os sólidos são retidos no recipiente (processamento em lote) ou eliminados constantemente ou intermitentemente (operação contínua) (SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015). A quantidade de biomassa coletada por sedimentação depende da taxa de sedimentação, do tempo de permanência da biomassa (pode ser aumentada pela redução da vazão) e da distância de decantação (pode ser reduzida pela redução da vazão). Três tipos de centrífugas são usados dependendo do tamanho da cuba e do decantador de descarga de rolagem (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004). No entanto, esse processo pode ter algumas limitações, como a quebra da estrutura celular, devido à força gravitacional, e grandes volumes de meio exigem mais tempo e aumentam os custos operacionais (KNUCKEY et al., 2006; FAROOQ et al., 2015).

1.1.8.3 Sedimentação

Outro processo para recuperação de biomassa é a sedimentação por gravidade. É um processo usado para várias espécies de algas e, embora seja rudimentar, possui eficiência energética (RAWAT et al., 2011). Esta técnica permite a separação de uma suspensão de alimentação, em um substrato mais concentrado e um sobrenadante claro, e pode ser realizada por separadores de lamelas e tanques de sedimentação. Os separadores de lamelas oferecem uma área maior de sedimentação em comparação com os espessadores convencionais devido à orientação das placas. A suspensão de microalgas é continuamente bombeada, enquanto a suspensão é continuamente eliminada. Neste processo, energia é requerida para a etapa de bombeamento. Os flocculantes podem ser adicionados para aumentar a separação da biomassa e sua taxa de sedimentação. A separação de algas utilizando tanques de sedimentação é um

processo econômico e a densidade de microalgas desempenha um papel essencial na remoção de sólidos (UDUMAN et al., 2010).

1.1.8.4 Floculação

A floculação é um processo de separação que utiliza produtos químicos (floculantes) que permitem que as células suspensas sejam aderidas umas às outras (floculação), de modo que elas sedimentem mais facilmente. Os floculantes utilizados são divididos em categorias de coagulantes orgânicos e inorgânicos de cadeia longa. As células de microalgas têm uma carga superficial negativa e a adição de sais metálicos permite a agregação dos mesmos. É um processo amplamente utilizado na indústria para eliminar sólidos suspensos (KNUCKEY et al., 2006; RAWAT et al., 2011; FAROOQ et al., 2015; UMMALYMA et al., 2016).

A floculação é mais conveniente quando há grandes quantidades de meio para ser tratado por meio de um processo de recuperação de biomassa e pode ser aplicado a muitas espécies (UDUMAN et al., 2010; ARBIB et al., 2013), embora algumas vezes esse método sozinho possa ser ineficiente (UDUMAN et al., 2010). Há uma variedade de produtos químicos estudados para a floculação, e entre os mais efetivos estão o cloreto férrico, sulfato de alumínio, sulfato férrico e alguns polímeros de poliácridamida catiônica (praestol) (zetag 63 e zetag 92), e poliaminas catiônicas que produzem complexos em pH ótimo (UDUMAN et al., 2010; SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015). No entanto, a desvantagem no uso de floculantes inorgânicos é que altas concentrações são necessárias e isso resulta em uma biomassa contendo alumínio ou ferro (UMMALYMA et al., 2016). Apesar disso, tornou-se a primeira escolha nas indústrias de tratamento de águas residuais, adicionando sais como o sulfato de alumínio (ARBIB et al., 2013).

A quitosana tem sido estudada recentemente como um floculante orgânico que permite maior floculação, permitindo sedimentação mais rápida e um sobrenadante mais puro. É também não-tóxico e biodegradável, o que permite uma reutilização do meio (UMMALYMA et al., 2016).

Um dos fatores relevantes para o acréscimo da eficiência é o aumento do pH. A biomassa é sensível a certos valores de pH do meio de cultura e alguns estudos mostram como o incremento do pH melhora a eficiência da floculação (UMMALYMA et al., 2016).

Às vezes, quando há uma limitação de carbono ou nitrogênio ou outros fatores ambientais como pH, oxigênio dissolvido e a presença de alguns íons metálicos, uma agregação espontânea de partículas é gerada, e esse fenômeno é chamado de auto-floculação (UDUMAN et al., 2010; RAWAT et al., 2011; SHOW; LEE; MUJUMDAR, 2015).

No entanto, uma desvantagem deste método de floculação é que, após a coleta de biomassa, ele não pode ser separado em células individuais novamente (KNUCKEY et al., 2006).

1.1.8.5 Flotação

A flotação pode ser considerada um processo mais eficaz e vantajoso do que a sedimentação e é promissora em algas com células de pequeno diâmetro. A flotação é um método físico-químico, no qual bolhas carregadas (ar ou gás) interagem com as superfícies hidrofílicas carregadas negativamente nas algas. No final do processo, uma flotação é criada e recuperada. A estabilidade da flotação criada depende da área de contato das partículas de ar ou gás. Existem três principais técnicas de flotação: flotação por ar disperso, flotação por ar dissolvido e flotação eletrolítica. No entanto, pode ser um processo caro (UDUMAN et al., 2010; RAWAT et al., 2011).

1.1.9 Usos da biomassa

Após o crescimento de microalgas com a remoção dos nutrientes em águas residuais, a biomassa coletada pode ser usada em produtos de valor agregado. Dependendo das espécies de microalgas, a biomassa integral ou fracionada pode ser usada para ração animal, fertilizante orgânico, extração de produtos de valor agregado (carotenóides, pigmentos, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos ou lipídios) ou produção de biocombustíveis (SOEDER, 1980; RAWAT et al., 2011; SYDNEY et al., 2011).

Os produtos alimentícios podem ser melhorados pela adição de biomassa de microalgas, devido à composição bioquímica. Os carboidratos presentes nas microalgas são representados por amido, glicose, açúcar e outros polissacarídeos e a digestibilidade desses compostos é alta, razão pela qual a biomassa pode ser utilizada em pó integral em concentrados. Quanto ao

conteúdo total de lipídios presentes na biomassa, este varia na faixa de 1-70% do peso seco, dependendo da espécie. Os lipídios são compostos de glicerol, açúcares, bases esterificadas e ácidos graxos saturados ou insaturados (SPOLAORE et al., 2006; BECKER, 2007; RAJA et al., 2008). Lipídios podem ser classificados como polares e neutros. Nos componentes da membrana celular podem ser encontrados na forma de fosfolipídios e glicolipídios, carotenóides, tri-, di- e monoacilglicerol (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012).

Na produção de biocombustível, várias investigações foram realizadas para a produção de biodiesel (transesterificação de lipídios), biometano, bioetanol (fermentação de carboidratos), biohidrogênio, biobutanol (LI; DU; LIU, 2008; RAWAT et al., 2011). Entre as vantagens encontradas na produção de biodiesel estão as maiores taxas de crescimento, menores tempos de produção, menor área de cultivo em comparação às plantas, alta concentração e variedade de lipídios produzidos e uso de águas residuárias como meio de cultura. No entanto, as metodologias devem ser melhoradas para a extração de lipídios, uma vez que são complexos e com menor rendimento (RAWAT et al., 2011).

No estudo conduzido por Neveux et al. (2016), a biomassa produzida a partir de *Oedogonium* sp. para a produção de óleo biocrude, através das reações de liquefação hidrotérmica (HTL), mostrou que a composição elementar apresentou um teor de carbono de 38,5% do peso seco na oitava semana.

Ressalta-se que a composição da biomassa pode diferir significativamente nas fases de crescimento (logarítmica ou estacionária), além de variações na concentração do nutriente, temperatura, salinidade, pH e intensidade de luz (DUNSTAN et al., 1993). Atualmente, alguns estudos utilizam métodos como lipidômica, genômica, proteômica e metabolômica para o desenvolvimento de novas linhagens com maiores taxas de crescimento e biossíntese de lipídios, e a capacidade de produzir e acumular vários subprodutos de alto valor (RAWAT et al., 2011).

A ênfase na biotecnologia para a produção de biomassa de microalgas é caracterizada pela tecnologia, propriedades do produto, rendimentos, nutrição, toxicologia e economia (SOEDER, 1980). Considerando isso, existe um propósito múltiplo no tratamento de águas residuárias, na recuperação de água para reuso (irrigação), na mitigação de gases de efeito estufa (CO₂) e na geração de coprodutos (SOEDER, 1980; LI; DU; LIU, 2008).

1.1.10 Análise de custo-benefício

A recuperação de biomassa contribui com 20 a 30% do custo total de produção dos micro-organismos fotossintetizantes. Por isso, uma recuperação eficiente de biomassa indica um tratamento de alta qualidade e produção custo-efetiva (MOLINA GRIMA; ACIÉ FERNÁNDEZ; ROBLES MEDINA, 2004; ARBIB et al., 2013). Da mesma forma, outro aspecto fundamental é selecionar o sistema de cultivo, uma vez que afeta muito a eficiência e a relação custo-benefício de um processo de produção (LI; DU; LIU, 2008).

Ji et al. (2013), mostraram que o tratamento terciário de águas residuárias com microalgas e a adição de CO₂ resultaram em aumentos significativos no crescimento, na produção de biomassa e na produtividade lipídica de *Ourococcus multisporus*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*. Da mesma forma, uma diminuição na concentração total de nitrogênio e fósforo (abaixo dos limites de detecção) foi demonstrada após quatro dias de cultivo, demonstrando que é um método ambientalmente sustentável, com satisfatório custo-benefício.

Além disso, o cultivo de microalgas com meio artificial gera mais resíduos e custos adicionais que podem ser eliminados com o uso de águas residuais (SYDNEY et al., 2011).

1.1.11 Reutilização da água após tratamento terciário

A utilização de água reciclada para fins não potáveis oferece o potencial para a exploração de um recurso que pode substituir fontes potáveis existentes para tais usos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004), sendo cada vez mais reconhecida como uma estratégia sustentável de gestão da água, tendo em conta conceitos de segurança, confiabilidade, estabilidade, economia e distribuição para atender a diferentes necessidades dos usuários (CHEN et al., 2017).

Um quadro genérico centralizado de reutilização de água tem como base cinco componentes: fontes de água recuperada, tratamento, transmissão e armazenamento, distribuição e monitoramento, sendo que a segurança da qualidade da água deve ser garantida através destes cinco componentes (CHEN et al., 2017). Como exemplo de garantir os

componentes do sistema está o estudo realizado por Wiener; Jafvert; Nies, 2016 onde foi mostrado que a reutilização intencional de água para fins de consumo como irrigação paisagística ou agrícola nos meses de julho a outubro pode ter impactos ecológicos substanciais ao diminuir o fluxo de rios durante períodos vulneráveis de baixo fluxo no rio Wabash nos Estados Unidos. Por isto, deve-se levar em conta que os rios e zonas úmidas adjacentes recebam quantidades e qualidade de água necessária para manter as funções ecológicas.

Dependendo da quantidade e qualidade de água por parte dos usuários, a estrutura de um sistema centralizado de reutilização de água varia de padrões simples a mais complexos (CHEN et al., 2017). Pois quando se discute o tratamento de um sistema de reutilização, a preocupação principal continua sendo se a qualidade da água recuperada é apropriada para o uso pretendido. Usos de nível superior, como a irrigação de terras de acesso público ou legumes para serem consumidos sem transformação/processamento, exigem um maior nível de tratamento de águas residuais e confiabilidade antes da reutilização (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004). Os principais riscos para a saúde associados com os constituintes químicos de águas residuais são a contaminação que pode surgir a partir das águas subterrâneas e a acumulação de certos elementos tóxicos nas plantas. Por isso, a ingestão de substâncias tóxicas através da ingestão das culturas irrigadas com águas residuais contaminadas deve ser avaliada cuidadosamente (PESCOD, 1992).

Outro parâmetro importante na determinação da adequação da água a ser utilizada para a irrigação é a salinidade. A salinidade é determinada através da medição da condutividade elétrica (CE) e/ou os sólidos totais dissolvidos (STD) na água (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004). As águas residuais têm geralmente uma concentração mais elevada de sólidos e íons e maior condutividade elétrica do que a água doce, especialmente em regiões com climas quentes, devido à alta taxa de evaporação e à estação seca. Estes podem originar-se, por exemplo, de detergentes, material de lavagem e produtos químicos utilizados em diferentes processos (QADIR et al., 2015). A tolerância de salinidade das plantas varia muito, pelo qual deve ser escolhido cuidadosamente o cultivo onde vai ser usada a água para garantir que pode tolerar a salinidade da água de irrigação e, mesmo assim, o solo deve ser devidamente drenado e adequadamente lixiviado para evitar acúmulo de sal (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Usar micro-organismos fotossintetizantes para remoção de nitrogênio e fósforo em água residuária proveniente de biodigestão aeróbia de esgoto doméstico.

2.2 Específicos

- Avaliar o crescimento de *Chlorella vulgaris* CCMA-UFSCar 689 e *Monoraphidium contortum* CCMA-UFSCar 701 isolados de águas de mangue do Estado de São Paulo em água residuária de estação de tratamento de esgoto, em Erlenmeyer.
- Avaliar o crescimento de *Chlorella vulgaris* CCMA-UFSCar 689 e *Monoraphidium contortum* CCMA-UFSCar 701 isolados de águas de mangue do Estado de São Paulo em água residuária de estação de tratamento de esgoto em fotobiorreator fechado, por processo descontínuo, com uso de CO₂ proveniente de cilindro, bem como as porcentagens de remoção de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo.
- Determinar a composição centesimal das biomassas obtidas em cultivos em fotobiorreatores.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos e manutenção

Os micro-organismos fotossintetizantes isolados de águas de mangue do Estado de São Paulo, *Chlorella vulgaris* CCMA-UFSCar 689 e *Monoraphidium contortum* CCMA-UFSCar 701, são mantidos no laboratório de Biotecnologia Microalgal, Edifício Semi-Industrial, Universidade de São Paulo, em meio Bold (STARR; ZEIKUS, 1993) - APÊNDICE A, a uma temperatura de 25 ± 1 °C (MATSUWAKI; HARAYAMA; KATO, 2015). O meio Bold foi também utilizado neste trabalho como meio para cultivos padrão.

3.2 Água residuária

A água residual utilizada neste trabalho foi proveniente de uma estação de tratamento de esgoto doméstico tratado por meio de aeração deste em tanques por meio de pás que promovem a turbulência necessária para a incorporação de oxigênio no meio líquido. Após a passagem pelo tanque de aeração, o esgoto tratado passou por um tanque de decantação e a fração líquida foi coletada e armazenada em câmara fria.

Para a realização dos experimentos, a água residuária foi retirada da câmara fria, filtrada em papel de filtro de porosidade de 3,0 micrômetros e esterilizado em autoclave por 30 minutos. Após o resfriamento, este material foi utilizado nos cultivos das microalgas.

3.3 Experimentos realizados

3.3.1 Cultivos em Erlenmeyers

Foram realizados cultivos de *C. vulgaris* e *M. contortum* em frascos Erlenmeyers em água residuária e em meio Bold (cultivo padrão). Os cultivos foram realizados em triplicata a uma temperatura de 25 ± 1 °C (MATSUWAKI; HARAYAMA; KATO, 2015) e o valor de pH inicial foi de 7,5 (EISELE; ULLRICH, 1977; TALUKDAR, 2012). A frequência de agitação foi de 120 min^{-1} (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2006) com intensidade luminosa de $80 \pm 6 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (PÉREZ-MORA et al., 2016). Nos meios com água residuária, foram adicionadas

diferentes quantidades de glicose. Foi realizado um cultivo onde se empregou co-cultura das microalgas. A concentração celular inicial foi fixada em $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. No ensaio em co-cultura, o inóculo foi de $5,0 \times 10^5$ células.mL⁻¹ para cada microalga, totalizando uma concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Visando ter melhores condições de avaliar as diferenças em cultivos em Erlenmeyers e em fotobiorreatores, os inóculos foram produzidos nas mesmas condições dos ensaios em fotobiorreatores, porém em fotobiorreatores tubulares de 2,0 L com meio Bold (PÉREZ-MORA et al., 2016).

Na Tabela 1 são apresentados os experimentos, realizados em triplicata, com Erlenmeyers.

Tabela 1 – Experimentos realizados em Erlenmeyers

Experimento	Microalga	Meio de cultivo	Adição de glicose (mg.L ⁻¹)
E ₁	<i>C. vulgaris</i>	Bold	Sem adição
E ₂	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	Sem adição
E ₃	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	30
E ₄	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	70
E ₅	<i>M. contortum</i>	Bold	Sem adição
E ₆	<i>M. contortum</i>	Água residuária	Sem adição
E ₇	<i>M. contortum</i>	Água residuária	30
E ₈	<i>M. contortum</i>	Água residuária	70
E ₉	<i>C. vulgaris</i> + <i>M. contortum</i>	Água residuária	Sem adição

3.3.2 Cultivos em Fotobiorreator tubular

O fotobiorreator tubular utilizado foi do tipo air-lift, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Microalgal do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Foi constituído de tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm. O volume total do sistema foi de 3,7 L, sendo que o volume iluminado correspondeu a 2,2 L e o volume do frasco degaseificador foi de 1,5 L (Figura 3). A velocidade de fluxo da cultura foi de 26,5 cm.s⁻¹, com auxílio de uma bomba de ar. Foram introduzidas três esferas de nylon no sistema, com diâmetro de 8 mm para evitar a aderência das células na tubulação dos fotobiorreatores (PÉREZ-MORA et al., 2016).

Foram realizados cultivos em fotobiorreator tubular com água residuária e em meio Bold (cultivo padrão). Os cultivos foram realizados a uma temperatura de 25 ± 1 °C (MATSUWAKI; HARAYAMA; KATO, 2015) e o valor de pH foi mantido em $7,8 \pm 0,3$, com uso de CO₂ proveniente de cilindro (EISELE; ULLRICH, 1977; TALUKDAR, 2012) utilizando um aparelho controlador de pH Metler Toledo e uma válvula solenoide conectada ao cilindro do CO₂. A intensidade luminosa foi de 82 ± 5 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PÉREZ-MORA et al., 2016). Tendo em vista comparar as condições de crescimento das microalgas, foram realizados experimentos com as mesmas condições experimentais adotadas nos cultivos em Erlenmeyers e também nesta escala de cultivo foi incluído um experimento onde se verificou o crescimento em co-cultura das duas microalgas avaliadas neste trabalho (*C. vulgaris* e *M. contortum*). A concentração celular inicial foi fixada em $1,0 \times 10^6$ células.mL⁻¹. No caso de co-cultura, como para os cultivos em Erlenmeyers, a concentração inicial de cada microalga foi de $5,0 \times 10^5$ células mL⁻¹. As condições de preparo de inóculo foram as mesmas relatadas no item 3.3.1.

Os experimentos foram realizados em duplicata e tem suas condições apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Experimentos realizados em fotobiorreatores

Experimento	Microalga	Meio de cultivo	Adição de glicose (mg.L⁻¹)
B₁	<i>C. vulgaris</i>	Bold	Sem adição
B₂	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	Sem adição
B₃	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	30
B₄	<i>C. vulgaris</i>	Água residuária	70
B₅	<i>M. contortum</i>	Bold	Sem adição
B₆	<i>M. contortum</i>	Água residuária	Sem adição
B₇	<i>M. contortum</i>	Água residuária	30
B₈	<i>M. contortum</i>	Água residuária	70
B₉	<i>C. vulgaris</i> + <i>M. contortum</i>	Água residuária	Sem adição

Figura 3 – Esquema do fotobiorreator: (1) sistema airlift; (2) sistema de amostragem; (3) tubo de silicone externo; (4) frasco degaseificador com agitação por turbina de Rushton; (5) tubos de vidro; (6) lâmpadas fluorescentes de 20W; (7) sistema de saída de ar; (8) membrana de 0,22 μm para adição de glicose; (9) sistema de pH; (10) sistema de CO_2 ; (11) esfera de nylon. “M” no esquema corresponde ao motor para a agitação no frasco degaseificador.

3.4 Técnicas analíticas

Para o acompanhamento dos experimentos e avaliação das biomassas obtidas, foram adotadas as técnicas analíticas descritas a seguir.

3.4.1 Medidas utilizadas para o acompanhamento dos experimentos

3.4.1.1 *Determinação da concentração celular*

Para quantificar o número de células presente nos cultivos dos microrganismos fotossintetizantes em determinado volume foi realizado em duplicata contagens diretas utilizando câmara de Neubauer em um microscópio óptico (BX51). Esse método foi escolhido por permitir diferenciar as células em co-cultura. Adicionalmente, esse método é mais robusto frente a variações metabólicas e físicas das microalgas (LOURENCO, 2006).

3.4.1.2 *Determinação do valor de pH*

O valor de pH foi determinado em aparelho de pH Metler Toledo.

3.4.1.3 *Determinação de nutrientes*

Para a medida de componentes solúveis na fase líquida do meio de cultivo, o seguinte procedimento foi adotado:

- I. As vidrarias usadas nas metodologias foram lavadas com 1% de Extran e submergidas em uma solução de Extran ao 5% por 24 horas. Subsequentemente, o material foi enxaguado com água e colocado em uma solução de ácido clorídrico al 10% por 20 minutos. Passado este tempo, toda a vidraria foi lavada com água destilada (três vezes).
- II. As amostras foram previamente filtradas, através de um filtro de membrana de fibra de vidro de 0,45 μm , para eliminar a matéria orgânica em suspensão na água.

As amostras filtradas foram submetidas às análises de concentrações de nitrato, nitrito, amônio e/ou fósforo para os experimentos realizados em fotobiorreatores, dependendo do meio de cultivo utilizado.

A caracterização do efluente utilizado para este estudo foi avaliada pelas metodologias analíticas a seguir, onde mediu-se as concentrações de nitrato, nitrito, amônio e fósforo.

3.4.1.4 *Determinação do teor de nitrato (NO_3^-) Protocolo 4500 (NO_3^-) A e B: APHA, 2000:*

O procedimento para a determinação da concentração de nitrato foi realizado mediante o uso do espectrofotômetro na faixa de luz ultravioleta 220 nm para uma primeira leitura e 275 nm para uma segunda leitura, a fim de subtrair as interferências da matéria orgânica dissolvida. Ao mesmo tempo, as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico (HCl) 1 N, retirando as possíveis interferências apresentadas pelo hidróxido ou carbonato de cálcio.

Para a aplicabilidade deste método foi construída curva padrão utilizando uma solução de Nitrato de Potássio (KNO_3) (ver Figura 4).

Figura 4 – Curva calibração do teor de nitrato (NO_3^-)

3.4.1.5 *Determinação do teor de nitrito: MACKERETH et. al., 1978/ CARMOUZE, 1994:*

A determinação do teor de nitrito foi realizada pela reação de Griess, onde num meio ácido, o ácido nitroso reage com a sulfanilamida para formação de um composto diazônico. O qual reage com o bicloridrato, para formação da coloração rosa. As medidas de absorbâncias

das amostras foram determinadas pela leitura em espectrofotômetro a 543nm (MACKERETH; HERON; TALLING, 1978; CARMOUZE, 1994). O composto aminado empregado nesta análise foi o hidrocloreto de sulfanilamida, acoplado ao n-(1 Naftil) etilenodiamina dihidrocloreto. A curva padrão de nitrito é mostrada a seguir sendo que a solução padrão foi realizada com nitrito de potássio (KNO_2) (ver Figura 5).

Figura 5 – Curva calibração do teor de nitrito

3.4.1.6 Determinação do teor de amônio: KOROLEFF, 1976 / CARMOUZE, 1994:

Na metodologia para analisar a concentração de amônio foi fundamentada na reação de Berthelot, onde o íon de amônio reage com o fenol, em meio alcalino e em presença de hipoclorito de sódio. Tendo a formação de indofenolato (complexo azul). A absorbância foi medida por leitura em espectrofotômetro a 630 nm (CARMOUZE, 1994; KOROLEFF, 1999). Para este método foi construída uma curva padrão de amônio utilizando uma solução padrão de cloreto de amônio (NH_4Cl) (Figura 6).

Figura 6 – Curva calibração do teor de amônio

3.4.1.7 Determinação do teor de fosfato: STRICKLAND; PARSONS, 1965 /CARMOUZE, 1994:

A determinação do teor de fósforo foi realizada mediante a medição das formas de fosfato inorgânico dissolvido, convertidas em ortofosfato durante oxidação por digestão com o uso do espectrofotômetro a 885 nm (STRICKLAND; PARSONS, 1960). Para isto, foi necessária a formação do ácido fosfomolibdico (complexo azul intenso) mediante a reação do ortofosfato com o molibdato de amônio, tartarato de antimônio e potássio em meio ácido.

Foi construída uma curva de calibração com uma solução padrão de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) (ver Figura 7).

Figura 7 – Curva calibração do teor de fósforo

3.4.1.8 Determinação de DQO

A metodologia para analisar a demanda química do oxigênio (DQO) foi baseada na quantidade de oxigênio (mg.L⁻¹) necessário para oxidar a matéria orgânica presente na água residual, para isto, foi utilizada uma solução de digestão com dicromato de potássio (composto oxidante) em meio ácido na presença de um catalisador (sulfato de prata) a 150°C por 2 horas. Tendo como resultado a conversão da matéria orgânica em dióxido de carbono e água. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 600 nm e os tubos foram lavados com H₂SO₄ 20% para eliminar interferentes de amostras anteriores antes de cada análise. Para esta metodologia foi construída uma curva padrão com uma solução padrão de biftalato de potássio Figura 8.

Figura 8 – Curva para determinação da demanda química de oxigênio (DQO) nas fases aquosas das águas residuárias

3.4.2 Análise da Biomassa

Após o cultivo celular, a suspensão celular foi centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos. Essa suspensão foi lavada duas vezes com água deionizada e a biomassa foi seca em estufa a 65°C por 12 horas (PELIZER et al., 2003). Após trituração da biomassa seca, foi avaliada a composição centesimal da biomassa conforme metodologias apresentadas a seguir.

a) Determinação do teor de proteína total

A determinação do teor de proteína total foi realizada pelo clássico método de Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984). Para realizar o método descrito por Kjeldahl, empregaram-se amostras desengorduradas, resultantes da análise de lipídios totais, secas e pulverizadas, que foram submetidas a digestão, destilação e titulação.

Para a digestão, as amostras previamente desengorduradas foram retiradas do cartucho Soxhlet, e secas em dessecador. Após secagem, foram pesadas ($25,5 \pm 0,50$ mg da amostra em papel manteiga), e colocadas no tubo de ensaio, no qual foi adicionado 2g do catalizador (1,9 g de sulfato de potássio e 10mg de sulfato de cobre) e 3mL de ácido sulfúrico. O material foi

aquecido a 350°C em bloco digestor na capela de exaustão até que o material contido no tubo de ensaio ficar límpido. O branco foi realizado da mesma maneira sem a adição da biomassa.

Para a destilação, foram colocados em um Erlemeyer 5 mL de ácido bórico saturado para recebimento da amônia, e adicionados na parte superior do aparelho 10mL de hidróxido de sódio à 60% na amostra. O processo de destilação da amônia foi iniciado e foi recolhido aproximadamente 50 mL no frasco de Erlemeyer. Por último, a solução foi titulada com HCl 0,042N, utilizando-se como indicador a mistura de vermelho de metila e azul de metileno.

b) Determinação do teor de lipídios totais

A fração lipídica total foi determinada por metodologia baseada em extração com solventes apolar e polar (PELIZER et al., 1999). A amostra foi macerada e transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo de uma mistura de solventes cloroformio-metanol 2:1 v/v até o líquido ficar límpido (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984; OLGUÍN et al., 2001) e o solvente foi retirado por meio de um rota-evaporador. O material obtido reúne os ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos.

c) Determinação do teor de cinzas

Incineração de amostras em mufla, até a eliminação completa do carvão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). Foi pesada amostra desengordurada, resultante da análise de lipídios totais, seca e pulverizada, a qual foi transferida para cadinhos previamente tarados. Esta amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada aumentando, gradativamente, a temperatura até, $600 \pm 25^\circ\text{C}$. O gradiente de temperatura usado foi de 30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C. Os cadinhos foram transferidos para o dessecador até esfriar e depois foram pesados.

d) Determinação do teor de carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado através do cálculo da diferença entre as porcentagens dos demais componentes da biomassa.

3.5 Análise dos resultados

Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, para determinar se os dados foram distribuídos normalmente e o teste de Levene para determinar a homogeneidade das variâncias. Finalmente, foi realizado um teste de Kruskal-Wallis para verificar se todas as medianas são iguais ($p > 0,05$) no crescimento de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residual com e sem adição de glicose e em meio Bold.

Para todos os testes estatísticos foi utilizado um nível de significância igual a 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos referentes ao crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes em água residual e em meio Bold, em Erlenmeyers e em fotobiorreatores, de forma isolada, ou em co-cultura. Nos cultivos em fotobiorreatores também foi possível acompanhar o decaimento da concentração de nutrientes devido ao consumo pelos micro-organismos, bem como avaliar a composição das biomassas obtidas.

4.1 Cultivo das microalgas em Erlenmeyers

4.1.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

As curvas de crescimento de *C. vulgaris* evidenciam a importância da adição de glicose nas águas residuais (Figura 9). Enquanto que nos ensaios com meio Bold e com água residual sem adição de glicose o crescimento foi muito baixo, chegando a valores da ordem de $1,2 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Tabela 3), os experimentos com adição de glicose na água residuária promoveram crescimento superior de aproximadamente 82% aos encontrados no meio Bold (Experimento E₁).

Figura 9 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com *C. vulgaris* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■)

A adição de glicose também evitou a fase lag dos cultivos (Figura 9), provavelmente por fornecer energia prontamente para os cultivos de *C. vulgaris*. Bhatnagar; Chinnasamy; Das (2012) já haviam relatado que a adição de fontes de carbono orgânicas em águas residuárias favorecem o crescimento das microalgas. No entanto, estes autores haviam indicado adições destas fontes da ordem de 10.000 mg.L⁻¹. Neste trabalho, foram avaliadas concentrações bastante menores (30 e 70 mg.L⁻¹) tendo em vista que se fossem adicionadas quantidades maiores de glicose, como o reportado nessa patente, haveria um acréscimo substancial nos valores de demanda química de oxigênio (DQO), o que não é desejado em uma estação de tratamento de efluentes.

A suplementação das águas residuárias com glicose favoreceu o crescimento mixotrófico da *C. vulgaris*. De fato, é reportado o crescimento de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias em condições mixotróficas (IHLENFELDT; GIBSON, 1977; CERÓN GARCÍ et al., 2000; BOUARAB; DAUTA; LOUDIKI, 2004; CHEN et al., 2006) levando a maiores valores de produtividade em células (OGBONNA; TANAKA, 2000), o que é decorrente de maiores concentrações celulares finais e/ou menores tempos para atingir estas concentrações. O comportamento do aumento de produtividade em células também foi observado para o crescimento de *C. vulgaris* com água residuária suplementada com glicose tanto na concentração de 30 mg.L⁻¹ como 70 mg.L⁻¹, sendo nestes casos devido ao grande

aumento de concentração celular máxima, uma vez que nos cultivos suplementados com glicose os tempos de cultivo (Tc) foram maiores (Tabela 3). Os valores de pH final foram maiores nos cultivos realizados com água residuária, independentemente da adição de glicose.

Tabela 3 – Valores médios máximos de concentração celular (Xm), tempos de cultivo (Tc), produtividades em células (Px) e valores finais de pH obtidos nos cultivos de *C. vulgaris* em Erlenmeyers

Experimento	Xm (células.ml ⁻¹)	Tc (dias)	Px (células ml ⁻¹ d ⁻¹)	pH Final
E ₁	1,25x10 ⁶	4	6,25x10 ⁴	7,23
E ₂	1,21x10 ⁶	4	5,25x10 ⁴	9,37
E ₃	2,28x10 ⁶	6	2,13x10 ⁵	9,36
E ₄	2,25x10 ⁶	6	2,08x10 ⁵	9,77

A adição de compostos orgânicos, como glicose, acetato, lactato, entre outros, pode favorecer o crescimento dos micro-organismos fotossintetizantes por já fornecer a eles moléculas no qual o carbono já está na forma parcialmente reduzida, permitindo que as células tenham uma fonte de energia pronta se comparada com os processos fotoautotróficos, onde as células necessitam fazer a fotossíntese para que possam reduzir o CO₂ a compostos orgânicos, como a glicose, por exemplo, que é utilizada nos processos bioquímicos celulares, inclusive como bloco construtor de polímeros, como polissacarídeos, por exemplo, ou que pode ser direcionada para processos de acúmulo de energia em forma mais reduzida, como ácidos graxos (RADAKOVITS et al., 2010). Embora seja aparentemente contraditória a adição de fonte de carbono orgânica em água residuária que passou por um tratamento secundário de efluente, desde que adicionada em pequenas quantidades, ao favorecer o crescimento celular aumenta a demanda por nutrientes como fósforo e nitrogênio, contribuindo para a depuração destes. Adicionalmente, como a quantidade de fonte de carbono orgânica é pequena, esta pode ser consumida ao longo do cultivo microbiano, seja pelos micro-organismos fotossintetizantes, seja pela população bacteriana presente no cultivo. Com relação a este aspecto, outra vantagem da pequena adição de fonte de carbono é que não há um crescimento exacerbado de bactérias, pois com águas residuárias seria praticamente impossível trabalhar economicamente em condições axênicas. No que tange ao presente trabalho, foi possível trabalhar com cultura limpa nos cultivos em que não se empregou co-cultura de microalgas, como será apresentado posteriormente. No entanto, deve ser ressaltado que as cepas empregadas neste trabalho não são

axênicas, ou seja, não são isentas de bactérias. Embora também aparentemente seja prejudicial a presença de bactérias, pois poderiam competir por substrato com as microalgas, há trabalhos na literatura que relatam o benefício das bactérias, dentro de condições controladas, para o crescimento microalgal, com utilização de compostos orgânicos liberados por células mortas, bem como pela produção de compostos úteis para o crescimento microalgal, como precursores de vitaminas, por exemplo (SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011; MUJTABA; LEE, 2017).

O fato de pequenas concentrações adicionadas de glicose possibilitarem o crescimento adequado das microalgas sugere que em estações de tratamento de esgoto poderia vir a ser possível deixar níveis residuais de demanda química de oxigênio no tratamento secundário, de modo que o material orgânico residual contribuísse para o maior crescimento microalgal. No entanto, deve ser ponderado que estes resultados se referem a condições obtidas em Erlenmeyers, onde o crescimento microalgal é menor devido às menores condições de disponibilidade de luz, de agitação, bem como pelo fato dos cultivos não terem o controle de pH pela adição de dióxido de carbono. Dessa forma, devido à limitação do crescimento microalgal, a produção de oxigênio pelo processo de fotossíntese é reduzido, restringindo, consequentemente o crescimento bacteriano e sua demanda por carbono orgânico, tornando este mais disponível para as microalgas.

Os cultivos de *C. vulgaris* em Erlenmeyers foram dificultados pela aderência que as células apresentaram as paredes, o que pode ter dificultado o crescimento celular devido ao menor contato que as células apresentam com o meio nutriente, uma vez que formaram um biofilme na superfície do frasco.

4.1.2 Cultivo de *Monoraphidium contortum*

Os cultivos de *M. contortum* em Erlenmeyers também foram favorecidos pelo uso de água residuária em vez do meio padrão (meio Bold), ficando evidente que em nenhuma condição com uso de água residuária houve fase lag (Figura 10). Sendo a água residuária um resíduo, tem uma diversidade muito grande de compostos orgânicos e inorgânicos em sua composição, muitos dos quais podem favorecer o crescimento microalgal. No entanto, deve ser ressaltado que águas residuárias provenientes de tratamento de esgoto podem conter substâncias que podem inibir o crescimento de microalgas, o que provavelmente não aconteceu no presente trabalho com o lote colhido para a realização deste trabalho experimental.

Com relação ao comportamento desta microalga em água residuária, seu comportamento, no entanto, diferiu do apresentado pela *C. vulgaris*. Embora a adição de glicose tenha antecipado o crescimento celular, com menores tempos de cultivo, levou a uma relativa menor quantidade de biomassa produzida (Tabela 4). Isso indica que, embora ambos micro-organismos sejam microalgas, apresentam um metabolismo diferente, evidenciando o efeito mais benéfico da adição de glicose nos cultivos com *C. vulgaris*, o que de certa forma já seria esperado, tendo em vista a clara capacidade que este micro-organismo tem para consumo de carbono orgânico, sendo inclusive, possível cultivá-lo em condição heterotrófica (BURRELL; INNISS; MAYFIELD, 1984).

Apesar da menor concentração celular máxima quando da adição de glicose na água residual, os menores tempos de cultivo, que foram pelo menos a metade do cultivo onde não se adicionou glicose na água residuária (Tabela 4), levaram a produtividades em células pelo menos 1,8 vezes maiores que o cultivo sem adição de glicose. O comportamento do valor de pH final foi semelhante ao que aconteceu com o cultivo de *C. vulgaris*, com maiores valores encontrados com o uso de água residuária.

Comparando as concentrações celulares máximas dos cultivos de *C. vulgaris* e *M. contortum*, em todas as condições experimentais houve um crescimento maior de *M. contortum*, chegando a ser uma ordem de grandeza maior que o crescimento da *C. vulgaris* com água residuária como meio de cultivo.

Também no caso dos cultivos com *M. contortum* houve dificuldades em se trabalhar em Erlenmeyers, com formação de grumos, que embora fossem facilmente desfeitos com agitação mais vigorosa, podem também ter provocado diminuição de crescimento devido a sombreamento e menor condição de mistura, além do efeito da falta de correção de pH.

Dentre os dois tipos de dificuldade encontrados para as duas microalgas em Erlenmeyers, a aderência aos frascos apresentada pela *C. vulgaris* pareceu ser mais prejudicial, dificultando sua suspensão no meio de cultivo, o que pode também ter contribuído para a obtenção de menores concentrações celulares máximas.

Figura 10 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com *M. contortum* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L^{-1} (○) e 70 mg.L^{-1} (■)

Tabela 4 – Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) e valores finais de pH obtidos nos cultivos de *M. contortum* em Erlenmeyers

Experimento	X_m (células.ml ⁻¹)	T_c (dias)	P_x (células ml ⁻¹ d ⁻¹)	pH Final
E ₅	$5,55 \times 10^6$	18	$2,53 \times 10^5$	7,68
E ₆	$2,76 \times 10^7$	28	$9,5 \times 10^5$	10,22
E ₇	$2,45 \times 10^7$	14	$1,68 \times 10^6$	9,23
E ₈	$2,40 \times 10^7$	12	$1,92 \times 10^6$	9,65

4.1.3 Cultivo de co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum*

As cepas utilizadas neste trabalho foram isoladas de regiões de mangue do Estado de São Paulo. A cepa de *Chlorella vulgaris* CCMA-UFSCar 689 é proveniente do Rio Grajaúna, Parque Estadual da Serra do Mar, Estação Ecológica Jureia-Itatins (Peruíbe – SP). A cepa de *Monoraphidium contortum* CCMA-UFSCar 701 é proveniente do Rio Paciência, Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Picinguaba (Ubatuba – SP). Por serem de origem estuarina, em que as águas apresentam, de um modo geral, maior salinidade que as águas de lagoas

continentais, estas cepas teriam, em princípio, maior resistência às águas residuárias mais salinas provenientes de tratamento secundário de esgoto.

Visando avaliar o crescimento em co-cultura, seja do ponto de vista de crescimento total, seja do ponto de vista de crescimento relativo, foi conduzido um experimento com água residual sem adição de glicose, apresentado na Figura 11, onde estão apresentados os valores de contagem total dos micro-organismos, isto é, a soma das concentrações celulares de *C. vulgaris* e *M. contortum*. Esta avaliação do crescimento em co-cultura é importante, pois pode contribuir para o conhecimento do comportamento desses micro-organismos em escala industrial, de modo que possam ser previstos comportamentos frente a diferentes condições ambientais.

Foi possível diferenciar bem os micro-organismos avaliados neste trabalho, pois apresentam morfologias distintas. Células de *Chlorella vulgaris* (BEIJERINCK, 1890) apresentam-se na forma de células de esféricas, solitárias ou, eventualmente, formando pequenos agregados. Apresentam também cloroplasto único e parietal. Células de *Monoraphidium contortum* (KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, 1969) apresentam-se na forma de células solitárias, alongadas e lunadas. Da mesma forma que a células de *C. vulgaris*, apresentam cloroplasto único e parietal.

Micro-organismos usados em co-culturas são selecionados de um modo geral a partir de associações naturais e por perfil de metabólitos, que envolvem a interação destes micro-organismos frente aos produtos liberados pelo outro micro-organismo (PADMAPERUMA et al., 2018). A seleção de micro-organismos que vivem no mesmo ambiente e, preferencialmente, no mesmo ambiente, pode facilitar esse processo, uma vez que por este motivo provavelmente não são afetados negativamente pelos metabólitos excretados por eles.

Asmare; Demessie; Murthy (2014), avaliaram o cultivo de *C. vulgaris* em co-cultura com *Scenedesmus dimorphus* para remoção de nutrientes de água residuária, em duas diluições (10 e 25%) de uma instalação leiteira, sendo que a co-cultura levou a maiores crescimentos de biomassa e consumo de nutrientes da água residuária como a diluição de 25%. Esse tipo de abordagem de cocultura de microalgas é relativamente nova, mas, como comentado acima, é de muita importância principalmente para processos onde não há necessidade de monoculturas, como é o caso do trabalho com águas residuárias, onde se visa remoção de nutrientes e produção

de biomassa que possa ter finalidade comercial, como biocombustível e/ou biofertilizante, por exemplo.

Neste cultivo (Figura 11), não foi observada fase lag de crescimento, como ocorreu no cultivo em monocultura de *M. contortum*. O crescimento em co-cultura levou a parâmetros de cultivo intermediários se comparado com os cultivos em monocultura de *C. vulgaris* e *M. contortum*, concentração celular máxima de $1,97 \times 10^6$ células ml^{-1} , tempo de cultivo de 10 dias e produtividade em células de $9,7 \times 10^4$ células $\text{ml}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$.

Como se observa na Figura 12, a partir do primeiro dia de cultivo houve uma predominância de células de *M. contortum*, que se manteve com uma proporção da ordem de 60% até o final do cultivo.

Deve ser ressaltado que embora tenha ocorrido a predominância da microalga *M. contortum*, condições experimentais distintas destas poderiam levar a comportamentos diferentes, sendo, portanto, este um campo de pesquisa que precisa ser mais explorado para que se possa aumentar a segurança em cultivos em grande escala, pelo aumento da previsibilidade do comportamento microbiano e, conseqüentemente, com maior interesse industrial.

Figura 11 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em Erlenmeyers com co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residuária sem adição de glicose

Figura 12 – Proporção entre células de *C. vulgaris* e *M. contortum* em função do tempo em cultivo em Erlenmeyers em água residuária sem adição de glicose

4.2 Cultivo das microalgas em fotobiorreator

Os cultivos em fotobiorreatores fechados são promissores nos cultivos de microalgas, pois favorecem o crescimento celular pela melhor distribuição de luz devido ao aumento da relação área/volume. Adicionalmente, permitem a condução do cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes sob maiores condições de assepsia, com menor probabilidade de contaminação, menores perdas de líquido por evaporação, bem como menor perda de nutrientes voláteis, pois permite o trabalho com condensadores (CARVALHO et al., 2014). Outra vantagem destes reatores é que é possível adicionar gases no sistema com mais eficiência e ao mesmo tempo capturar gases produzidos, como o oxigênio, por exemplo. De fato, a captura de gases, seja para seu reuso no reator, como o gás carbônico, seja para uso em outros processos industriais, como o oxigênio, contribui para a diminuição de custo e/ou agregação de valor ao processo. Nesse sentido, há muitos trabalhos na literatura e processos em escala de produção que usam este tipo de reator. Embora o custo de instalação seja maior que os fotobiorreatores abertos, considerando a longevidade de uso dos fotobiorreatores fechados pelo emprego de matérias de durabilidade alta, como vidro, por exemplo, seu custo é diluído ao longo do tempo. Particularmente, em casos onde a mistura é importante, os reatores tubulares, por permitirem

maiores condições de turbulência que fotobiorreatores abertos, são úteis para manter a suspensão celular mais homogênea. Um fator que seria prejudicial é a aderência das células nas tubulações. No entanto, foi desenvolvido em trabalho anterior (PÉREZ-MORA et al., 2016) um sistema com adição de esferas de nylon que evita esta aderência e permite a obtenção de altas concentrações celulares ao final dos cultivos, chegando a valores de 4963 mg.L⁻¹ de *Botryococcus braunii*.

Um dos componentes dos fotobiorreatores tubulares é o frasco degaseificador, normalmente utilizado quando se usa o sistema air lift para a circulação celular. Neste caso, também diferentes tipos de frascos podem ser utilizados, tendo nosso grupo de pesquisa utilizado um frasco em que há chegada de líquido pela parte lateral superior dele e com saída pela parte inferior, com um sistema de funil (PÉREZ-MORA et al., 2016), de tal forma que tem se mostrado eficiente para muitas microalgas e para *Arthrospira platensis* (CRUZ-MARTÍNEZ et al., 2015; PÉREZ-MORA et al., 2016; BRESAOLA et al., 2019). No entanto, considerando as dificuldades encontradas nos cultivos em Erlenmeyers com as cepas do presente trabalho, julgou-se necessário o desenvolvimento de uma nova configuração de fotobiorreator tubular, na qual o frasco degaseificar tivesse agitação mecânica. Dessa forma, foi construído um novo fotobiorretor tubular (Figura 3) no qual o frasco degaseificador foi acoplado por meio de um eixo provido de uma turbina Rushton a um motor para que essa agitação fosse realizada. A turbina tipo Rushton foi o tipo de agitador escolhido por promover um fluxo radial do fluído, fazendo com que as esferas de nylon do sistema sejam descoladas para as laterais do frasco e com consequente descida para a tubulação do fotobiorreator.

O controle de pH, por meio da adição de gás carbônico (mediante válvula solenóide), contribuiu para o suprimento do carbono incorporado nas células. De acordo com o estudo de Sutherland et al., 2015 as microalgas cultivadas em água residuária foram capazes de aumentar a eficiência de utilização de luz e assimilar o carbono inorgânico, demonstrando que a adição de CO₂ melhorou a fotofisiologia das microalgas e, como resultado, obteve-se uma maior concentração de biomassa. Desta forma, o carbono seria suplementado no cultivo dos microorganismos fotossintetizantes em fotobiorreator tubular e não seria um nutriente limitante. Assim, o valor de pH foi mantido em $7,7 \pm 0,3$ com auxílio de injeção de gás carbônico, mantendo esta fonte de carbono disponível para o crescimento microbiano. De fato, este pH é adequado para o crescimento de microalgas. De acordo com os estudos realizados por Ge; Liu; Tian (2011) e Dayananda et al. (2007), o valor de pH na faixa de 6,0 - 8,5 não levou a efeitos

significativos sobre a produção de biomassa (cresceu sem inibição evidente) da microalga *B. braunii*. Quanto ao trabalho com águas residuais provenientes de tratamento de esgoto, há micro-organismos fotossintetizantes que crescem sem inibição com valores de pH desde aproximadamente 7,0 até 8,5 (KONG et al., 2010; XIN; HONG-YING; JIA, 2010; LIU et al., 2016), o que justifica a menor mudança no pH da água residuária e que não seja um fator limitante. A correção de pH com auxílio de gás carbônico também contribuiria para não aumentar o pH do meio, pois o crescimento microbiano, pelo consumo do carbono inorgânico, poderia distanciar o pH dos corpos hídricos, o que forçaria a uma correção de pH da água residuária para ser lançada nestes, com aumento de salinidade.

O cultivo em fotobiorreator tubular também é útil no sentido de remover nutrientes, pois permite a obtenção de valores maiores de crescimento celular, como comentado acima. Considerando que o valor de nitrogênio das biomassas das microalgas e cianobactérias varia entre 3,74% e 11,67% (TIBBETTS; MILLEY; LALL, 2015), fica claro que o maior crescimento em fotobiorreator tubular levaria a um consumo maior deste nutriente para a formação celular, fazendo com que houvesse um maior consumo deste nutriente da água residuária, contribuindo consequentemente para sua depuração. O mesmo raciocínio para o íon fosfato, sendo que o fósforo representa aproximadamente 1% da biomassa seca de microalga (PÉREZ-MORA et al., 2016).

4.2.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

4.2.1.1 Avaliação do crescimento celular

As curvas de crescimento de *C. vulgaris* em fotobiorreator tubular estão apresentadas na Figura 13. Observa-se também no cultivo em fotobiorreator, como encontrado no cultivo em Erlenmeyers, que o crescimento em meio Bold apresentou um retardamento no crescimento da microalga em comparação com os cultivos em água residuária, embora, neste caso houve um crescimento satisfatório, com obtenção de concentrações celulares máximas apenas 12% menores que os cultivos com adição de glicose em água residuária e 11% maiores que o cultivo com água residuária sem adição de glicose (Tabela 5). Com relação às produtividades em células, pelo fato dos cultivos com água residual terem menor duração, os valores são pelo menos 57% maiores que aquelas obtidas com uso de meio Bold.

O efeito da adição de glicose na água residuária foi menos pronunciado no crescimento celular que nos cultivos em Erlenmeyers. Isso pode ter sido decorrente do fato do trabalho em fotobiorreator, por permitir uma melhor distribuição de luz, melhorar a captação de luz, tornando o processo fotoautotrófico mais importante que o metabolismo heterotrófico e/ou pelo fato do maior crescimento microalgal gerar maior quantidade de oxigênio no sistema, favorecendo a captação do carbono orgânico pelas bactérias presentes no meio, diminuindo, portanto a disponibilidade deste nutriente para as microalgas.

Comparando os resultados obtidos em fotobiorreator com aqueles obtidos em cultivos em Erlenmeyers, as diferenças tanto de concentração celular máxima quanto de produtividades são imensas, em média, 18,3 vezes maior (Tabela 3 e Tabela 5). Isso se deve ao fato do fotobiorreator possibilitar o cultivo em condições que limitam o crescimento celular encontradas em cultivos em Erlenmeyers. A parte da já reconhecida importância do controle do pH e maior disponibilidade de luz, particularmente, o uso das esferas de nylon e o emprego de um frasco degaseificador com agitação mecânica com uso de uma turbina de Rushton evitou que houvesse a adesividade das células tanto nos tubos do fotobiorreator como no frasco degaseificador, indicando a importância deste tipo de configuração do fotobiorreator quando do trabalho com células que têm essa tendência de adesividade.

Figura 13 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *C. vulgaris* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■)

Tabela 5 – Valores médios máximos de concentração celular (X_m), tempos de cultivo (T_c), produtividades em células (P_x) obtidos nos cultivos de *C. vulgaris* em fotobiorreator

Experimento	X_m (células.mL⁻¹)	T_c (dias)	P_x (células mL⁻¹.d⁻¹)
B₁	3,05x10 ⁷	7	4,21x10 ⁶
B₂	2,74x10 ⁷	4	6,60x10 ⁶
B₃	3,48x10 ⁷	5	6,76x10 ⁶
B₄	3,55x10 ⁷	5	6,90x10 ⁶

4.2.1.2 Avaliação da remoção de nutrientes e DQO

Nas Figura 14 a Figura 16 são apresentados os valores da concentração de nutrientes ao longo dos cultivos realizados com *C. vulgaris* em fotobiorreator. Pode ser observado que em todas as condições experimentais houve um contínuo decaimento da concentração dos nutrientes, sendo que nos casos em que se utilizou água residuária os valores finais de fosfato sofreram, proporcionalmente aos valores iniciais, as maiores quedas. De fato, a porcentagem de remoção para os cultivos com água residual e em meio Bold chegaram a valores da ordem de 90% e 32%, respectivamente. No caso do nitrato, em todos os cultivos, independentemente do meio, a porcentagem de remoção superou o valor de 99%. Isso evidencia a utilidade da *C. vulgaris* para remoção destes nutrientes de águas residuárias. No caso do íon nitrito, pode-se notar que seu valor é bastante baixo, da ordem de microgramas por litro no meio de cultivo, sendo proveniente principalmente de oxidação de amônio, o que comumente ocorre quando se trabalha com águas residuárias (RUIZ; JEISON; CHAMY, 2003). No entanto, neste trabalho os níveis de amônio estiveram abaixo do limite de detecção da metodologia analisada tanto nos cultivos de *C. vulgaris* como *M. contortum* e até mesmo nos experimentos onde se empregou co-cultura. A presença de nitrito quando do uso de meio Bold pode ter sido também decorrente de processos onde houve a formação de amônio, como lise celular, por exemplo, e as condições de aerobiose proporcionadas pelo processo de fotossíntese tenha levado à oxidação deste.

Figura 14 – Concentração de fosfato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *C. vulgaris* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■)

Figura 15 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *C. vulgaris* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■). Nos instantes 6 e 7 dias o valor de nitrato para o meio Bold foi abaixo do limite de detecção do método empregado para sua análise

Figura 16 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *C. vulgaris* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■)

Na Tabela 6 são apresentados os valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de *C. vulgaris* em fotobiorreator.

Os valores de DQO reduziram durante o cultivo de *C. vulgaris*, chegando a valores que não puderam ser detectados pela técnica analítica nos experimentos B₁ e B₂, que são os experimentos onde não foi adicionada glicose. Isso indica que adições de maiores quantidades de glicose poderiam ser prejudiciais pensando do ponto de vista ambiental, pois se por um lado, como visto anteriormente, o processo remove nitrogênio e fósforo do sistema poderia incluir matéria orgânica no meio residual. No entanto, os valores finais de DQO são relativamente baixos, estando dentro dos limites aceitáveis pela legislação para esgoto doméstico, que é de 120 mg.L⁻¹ (CONAMA, 2011).

Tabela 6 –Valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de *C. vulgaris* em fotobiorreator

Experimento	DQO inicial (mg.L ⁻¹)	DQO final (mg.L ⁻¹)
B₁	30,5	*
B₂	93,1	*
B₃	122,7	11,7
B₄	156,2	73,0

* Valor abaixo do nível de detecção da técnica analítica

4.2.2 Cultivo de *Monoraphidium contortum*

4.2.2.1 Avaliação do crescimento celular

Na Figura 17 são apresentadas as curvas de crescimento de *M. contortum* em fotobiorreator tubular. A dificuldade em crescimento no meio Bold também é observada no cultivo em fotobiorreator, como encontrado no cultivo em Erlenmeyers. Houve um longo período para que a célula iniciasse seu crescimento exponencial quando do uso de meio Bold, decorrente, provavelmente do fato deste meio ser sintético, com menor diversidade de nutrientes se comparado com a água residuária. No entanto, a maior disponibilidade de nitrogênio e fósforo neste meio permitiu a obtenção de uma concentração celular final maior que nos experimentos com uso de água residual para o crescimento microalgal (Tabela 7). Com relação às produtividades em células, pelo fato dos cultivos com água residual terem menor duração, os valores são pelo menos 57% maiores que aquelas obtidas com uso de meio Bold.

Com relação ao efeito da adição de glicose na água residuária, as velocidades de crescimento até o terceiro dia de cultivo foram muito semelhantes Figura 14. Mas ao contrário do que ocorreu com os experimentos em Erlenmeyers, o experimento com água residuária sem adição de glicose levou a um maior crescimento celular (Figura 17, Tabela 7). Nesse contexto, em um cultivo em escala de produção acoplado a uma estação de tratamento de esgoto, deveria ser avaliado se o trabalho com esta microalga necessitaria de uma depuração maior da matéria orgânica para seu crescimento.

Considerando apenas os experimentos em água residuária, o trabalho em fotobiorreator tubular levou a concentrações celulares máximas e produtividades em células 2,5 vezes e 8,7

vezes maiores que aquelas obtidas em Erlenmeyers, respectivamente. O aumento menor na concentração celular máxima no cultivo de *M. contortum* se comparado com o cultivo de *C. vulgaris* quando se muda o cultivo de Erlenmeyers para fotobiorreator pode indicar que o efeito de adesão é mais prejudicial ao crescimento celular do que o efeito de formação de grumos.

Figura 17 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *M. contortum* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ (○) e 70 mg.L⁻¹ (■)

Tabela 7 - Valores médios máximos de concentração celular (Xm), tempos de cultivo (Tc), produtividades em células (Px) obtidos nos cultivos de *M. contortum* em fotobiorreator

Experimento	Xm (células.ml ⁻¹)	Tc (dias)	Px (células ml ⁻¹ d ⁻¹)
B ₅	1,34x10 ⁸	10	1,33x10 ⁷
B ₆	7,94x10 ⁷	5	1,57x10 ⁷
B ₇	5,28x10 ⁷	4	1,30x10 ⁷
B ₈	5,61x10 ⁷	5	1,10x10 ⁷

4.2.2.2 Avaliação da remoção de nutrientes e DQO

Nas Figura 18 a Figura 20 são apresentados os valores da concentração de nutrientes ao longo dos cultivos realizados com *M. contortum* em fotobiorreator. Pode ser observado que em todas as condições experimentais houve um contínuo decaimento da concentração dos

nutrientes fosfato e nitrato, da mesma forma que ocorreu com *C. vulgaris*. A porcentagem de remoção para os cultivos com água residuária chegaram a valores da ordem de 98% tanto para o íon fosfato como para o íon nitrato. Isso evidencia a utilidade também da microalga *M. contortum* para remoção destes nutrientes de águas residuárias. No caso do uso do meio Bold, o valor de remoção foi de 30 %. No caso do íon nitrito, com este micro-organismo, ficou evidente a diferença de seu valor máximo de concentração no meio, dependendo do meio utilizado. No caso dos experimentos com água residuária, o valor máximo da concentração de nitrito foi com 2 dias de cultivo, o que pode ser decorrente da oxidação de pequena quantidade do íon amônio presente na água residuária, embora em menor concentração que a detectada pela metodologia analítica. No caso do meio Bold, o pico ocorreu com 6 dias de cultivo, o que pode ser decorrente da presença de produto de degradação de células possivelmente mortas durante a extensa fase lag. O oxigênio presente no meio do sistema de circulação por *air lift* pode ter contribuído para a oxidação do amônio no meio por bactérias presentes.

Figura 18 – Concentração de fosfato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *M. contortum* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (△), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ e 70 mg.L⁻¹ (■)

Figura 19 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *M. contortum* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ e 70 mg.L⁻¹ (■)

Figura 20 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com *M. contortum* em meio Bold (◆) e em água residuária, sem adição de glicose (Δ), e com adição de glicose em concentrações de 30 mg.L⁻¹ e 70 mg.L⁻¹ (■)

Na Tabela 8 são apresentados os valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de *M. contortum* em fotobiorreator.

Como ocorreu nos cultivos com *C. vulgaris*, os valores de DQO caíram durante o cultivo de *M. contortum*, chegando também a valores que não puderam ser detectados pela técnica analítica, o que correspondeu aos experimentos B₅ e B₆, que são os experimentos onde não foi adicionada glicose. Os valores finais de DQO foram, igualmente, aceitáveis, por estarem dentro do limite aceitável pela legislação.

Tabela 8 –Valores médios iniciais e finais de demanda química de oxigênio (DQO) nos meios de cultivo de *M. contortum* em fotobiorreator

Experimento	DQO inicial (mg.L ⁻¹)	DQO final (mg.L ⁻¹)
B ₅	112,8	*
B ₆	100,8	*
B ₇	129,1	72,6
B ₈	178,9	6,5

* Valor abaixo do nível de detecção da técnica analítica

4.2.3 Cultivo de co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum*

4.2.3.1 Avaliação do crescimento celular

Foi avaliado também o crescimento em co-cultura em fotobiorreator tubular, uma vez que as condições experimentais neste tipo de fotobiorreator são muito diferentes daquelas em Erlenmeyers, como comentado anteriormente. Na Figura 21 são apresentados os valores de contagem total dos micro-organismos *C. vulgaris* e *M. contortum*.

Neste cultivo, não ficou evidenciada uma clara fase lag de crescimento, embora o crescimento celular tenha ocorrido mais claramente a partir do segundo dia. O crescimento em co-cultura levou a concentrações celulares máximas (X_m) e tempos de cultivo (T_c) intermediários se comparado com os cultivos em monocultura de *C. vulgaris* e *M. contortum*, com valores de X_m e T_c de 4,01x10⁷ células.mL⁻¹ e 6 dias, respectivamente. No entanto, o parâmetro produtividade em células apresentou um valor maior (1,57x10⁷ células mL⁻¹d⁻¹) que aquelas obtidas com as monoculturas.

Como se observa na Figura 22, a partir do primeiro dia de cultivo houve uma predominância de células de *M. contortum*, que se manteve com uma proporção da ordem de 70% até o final do cultivo. Esse valor foi superior ao obtido quando do cultivo em Erlenmeyers, indicando que em condições em que o crescimento celular é favorecido o potencial de crescimento do *M. contortum* frente a *C. vulgaris* se torna mais evidente.

Figura 21 – Concentração celular (X) em função do tempo em cultivos em fotobiorreator com co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residuária sem adição de glicose

Figura 22 – Proporção entre células de *C. vulgaris* e *M. contortum* em função do tempo em cultivo em fotobiorreator em água residuária sem adição de glicose

4.2.3.2 Avaliação da remoção de nutrientes e DQO

Nas Figura 23 a Figura 25 estão os acompanhamentos das concentrações de nutrientes ao longo do cultivo em co-cultura. Pode se observar que a co-cultura não influenciou na utilização dos nutrientes fosfato e nitrato, nem alterou o perfil da curva de concentração de nitrato em função do tempo, que, de um modo geral, atingiu seu maior valor nos instantes iniciais do cultivo.

Figura 23 – Concentração de fosfato em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residuária sem adição de glicose

Figura 24 – Concentração de nitrato em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residuária sem adição de glicose

Figura 25 – Concentração de nitrito em função do tempo em cultivo em fotobiorreator com co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residuária sem adição de glicose

O cultivo em co-cultura também foi aceitável no tocante à legislação sobre águas residuárias de estação de tratamento de esgoto. O valor inicial da DQO neste experimento foi de 113,7 mg.L⁻¹ e o valor final foi de 57, 1 mg.L⁻¹. Assim, além do crescimento microalgal promover a remoção de nitrogênio e fósforo contribuiu para a remoção de matéria orgânica também, que foi equivalente a 49,8 %.

4.2.4 Avaliação da composição centesimal das biomassas obtidas em cultivos em fotobiorreator tubular

Na Tabela 9 são apresentados os valores médios da composição centesimal das biomassas obtidas nos cultivos em fotobiorreator tubular sob diferentes condições experimentais.

Considerando os lipídios, que são produzidos pelos micro-organismos, tem uma ampla gama de classes tais como acilglicerídeos, fosfolípidos, glicolípidos, lipoproteína, ácidos graxos, esteróis, hidrocarbonetos e pigmentos. Estas classes lipídicas têm propriedades químicas e físicas diferentes, como polaridade, viscosidade, solubilidade e localização celular que definem a sua disponibilidade durante a extração (DONG et al., 2016). A escolha do sistema de solventes e do sistema para a extração de lipídios de algas é muito importante, pois a eficácia na extração depende da permeabilidade da parede celular, bem como do tipo de organismo (LEE; YOON; OH, 1998). Estudo realizado por Lee et al. (1998), mostra que o solvente mais eficaz foi uma mistura de clorofórmio/metanol, onde foi observado que a maior parte dos lipídios da microalga *B. braunii* pode ser extraída através da utilização de agitação com esferas e mistura de clorofórmio/metanol. Este sistema de solventes foi também recomendado por Guckert; Cooksey; Jackson (1988), porque obtiveram uma recuperação quantitativa e reprodutível dos lipídios de *Chlorella* sp. com uma melhor recuperação de ácido graxo poli-insaturado de algas. Esse método tem sido sugerido por Olguín et al. (2001), para extração de lipídios de micro-organismos fotossintetizantes e foi adotado pelo nosso grupo para extração de lipídios de micro-organismos fotossintetizantes para análise de teor lipídico. No entanto, quando de processos industriais para extração de lipídios, para cada tipo de célula produzida, novos testes precisam ser realizados, de forma a otimizar as condições de extração com a relação à rendimento, tempo, bem como conservação dos ácidos graxos.

Tabela 9 – Resultados de composição centesimal das biomassas obtidas nos cultivos em fotobiorreator tubular sob diferentes condições experimentais

Experimento	Lipídios (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)*
B₁	27,18 ± 1,38	16,78 ± 0,45	9,81 ± 0,17	44,87
B₂	26,26 ± 1,51	18,14 ± 0,10	10,12 ± 0,11	48
B₃	26,39 ± 1,91	15,62 ± 0,34	7,26 ± 0,03	50,67
B₄	24,97 ± 2,72	15,68 ± 0,25	7,41 ± 0,44	49,96
B₅	36,92 ± 0,02	17,66 ± 0,35	9,42 ± 0,09	35,54
B₆	40,1 ± 3,41	18,12 ± 3,68	7,37 ± 0,02	34,2
B₇	40,14 ± 1,68	18,33 ± 1,55	5,46 ± 0,11	39,13
B₈	42,59 ± 1,41	15,27 ± 0,33	6,48 ± 1,21	34,39
B₉	29,46 ± 1,01	16,54 ± 1,44	9,66 ± 0,33	60,88

*Não foram apresentados os desvios por ser calculado por diferença

Um parâmetro muito importante na extração de lipídios altamente insaturados é a temperatura, pois são instáveis a elevadas temperaturas (acima de 70°C) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Além disso, o aquecimento na presença de alcoóis pode acelerar a transesterificação, e alterar os estados naturais dos lipídios (GUICKERT; COOKSEY; JACKSON, 1988), como por exemplo a configuração geométrica das duplas ligações dos ácidos graxos. Soxhlet é um método de extração onde a amostra é colocada com um refluxo descontínuo e intermitente do solvente, com a vantagem do solvente em ebulição ficar em um compartimento separado da amostra, e somente este resfriado, quando de sua condensação ficar em contato direto com a amostra, evitando assim a decomposição da gordura desta (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

O teor de lipídio obtido na Tabela 9 para os cultivos B₁ a B₄, que correspondem à *C. vulgaris*, está um pouco acima da faixa obtida por Rodrigues et al. (2016), (13 a 25%) em biomassa da cianobactéria *Arthrospira platensis* cultivada em tanques abertos com meio Schlösser modificado em processo descontínuo alimentado com sulfato de amônio e diferentes valores de pH. Estudo anterior para a cianobactéria *Spirulina platensis* afirma que em condições limitantes de nitrogênio a energia absorvida através da fotossíntese parece ser dirigida principalmente à acumulação de polissacarídeos, o qual proporciona uma redução da proporção de outros componentes celulares (SASSANO et al., 2010). No entanto, a *C. vulgaris* é uma microalga e estes organismos podem ser bons produtores de ácidos graxos, acumulando energia na forma de lipídios.

Considerando os cultivos B₅ a B₈, realizados como *M. contortum*, os teores lipídicos foram bem maiores, chegando a valores da ordem de 40%, demonstrando a capacidade maior desta microalga em acumular lipídios que a *C. vulgaris*. Esse alto teor lipídico pode ter contribuído para estes micro-organismos tenderem a formar grumos no meio de cultura, o que foi evidenciado nos cultivos em Erlenmeyers. O experimento B₉, conduzido em condições de co-cultura dessas microalgas apresentou um teor de lipídio intermediário, o que já era esperado no caso das microalgas não alterarem muito sua composição quando não estivessem crescendo em monocultura. Em estudo recente, Bresaola et al. (2019), trabalhando com cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, outra microalga, observou valores elevados de teor lipídico, com valores médios de 38,2%.

Os valores de proteínas obtidos não permitem evidenciar que haja uma diferença entre as cepas quanto à produção e armazenamento deste componente celular. Os valores são relativamente baixos se comparados com outras microalgas. Por exemplo, no estudo de Pérez-Mora et al. (2016), as biomassas de *Botryococcus braunii* provenientes de cultivos com meio Chu com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo apresentaram teores de proteínas numa faixa de 32,1 a 34,1%. No estudo de Tibbetts et al. (2015), *Nannochloropsis granulata* apresentou teor de proteína igual a 33,5% e *Neochloris oleoabundans* igual a 30,1%.

O teor de cinzas não foi dependente das condições de cultivo e também não dependeu da espécie cultivada, apresentando valores que ficaram entre 5 e 10 %, o que é comum para micro-organismos fotossintetizantes (MOLINO et al., 2018). No entanto, os valores foram um pouco inferiores aos de *Acutodesmus dimorphus*, que apresentou teor de cinzas de 14,5% no estudo de Tibbetts et al. (2015), o qual é semelhante ao valor obtido neste cultivo descontínuo ($13,03 \pm 1,26\%$).

Tendo em vista que o teor de cinzas não variou frente às condições experimentais, pode-se concluir que o teor de carboidrato representa quase metade do conteúdo da *C. vulgaris*, enquanto que representa um terço da massa da microalga *M. contortum*.

4.2.5 Análise estatístico

Conforme o teste de Shapiro-Wilk os resultados obtidos não são distribuídos normalmente ($p > 0,05$), e não apresentam homogeneidade das variâncias no teste de Levene ($p > 0,05$). Os resultados foram estatisticamente diferentes conforme Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) para crescimento celular em fotobiorreator de *Monoraphidium contortum* nos cultivos realizados em meio Bold e em água residual sem adição de glicose e nos experimentos de *Chlorella vulgaris* e *Monoraphidium contortum* em meio Bold para o porcentagem de remoção do fosfato.

5 CONCLUSÕES

Foi possível a utilização de água residuária para cultivo de *Chlorella vulgaris* e *Monoraphidium contortum*, tanto em cultivos em Erlenmeyers como em fotobiorreator tubular. Dentre estes, os cultivos em fotobiorreator tubular resultou em à obtenção de concentrações celulares máximas maiores.

A adição de glicose nas águas residuárias nas concentrações de 30 e 70 mg.L⁻¹, de um modo geral, favoreceu o crescimento celular em Erlenmeyers para *C. vulgaris*, com obtenção de concentração celular máxima de $2,28 \times 10^6$ células.mL⁻¹ com a adição de 30 mg.L⁻¹ desta fonte de carbono. Nos cultivos de *M. contortum* em frascos Erlenmeyers, embora não tenha sido evidenciado o aumento da máxima concentração celular com a adição de glicose, as produtividades em células aumentaram de uma ordem de grandeza se comparadas com a produtividade na condição em que não se adicionou esta fonte de carbono, atingindo valores médios iguais a $1,92 \times 10^6$ células mL⁻¹.d⁻¹ em cultivos com adição de 70 mg.L⁻¹ de glicose.

Os tempos para atingir a concentração celular máxima em fotobiorreator foram de 4 a 5 dias em água residuária e de 7 a 10 dias em meio padrão (meio Bold), dependendo da microalga cultivada. O cultivo de *M. contortum* em meio Bold levou à obtenção de uma concentração celular máxima de $1,34 \times 10^8$ células.mL⁻¹, porém com um tempo de cultivo de 10 dias.

A microalga *M. contortum* cresceu mais que a *C. vulgaris*, independentemente do tipo de condição de cultivo, mas a maior diferença foi em Erlenmeyers. Os valores de concentração celular máxima em fotobiorreator com uso de água residuária para *C. vulgaris* e *M. contortum*

foram de $3,55 \times 10^7$ células.mL⁻¹ e $5,61 \times 10^7$ células mL⁻¹, com adição de 70 mg.L⁻¹ de glicose na água residuária.

Os cultivos em co-cultura de *C. vulgaris* e *M. contortum* em água residual sem adição de glicose resultaram em parâmetros de crescimento intermediários que os de monocultura.

Em todos os cultivos com microalgas foi possível a depuração de fostato e nitrato do meio de cultura, com porcentagens de remoção destes nutrientes de até 99%. Em todos os cultivos também ocorreu diminuição do valor de DQO das águas residuárias utilizadas para o crescimento das microalgas.

Os teores de lipídios de *C.vulgaris* e *M. contortum* em fotobiorretor não sofreram grandes variações frente às condições experimentais e apresentaram valores médios de 26,2% e 39,9%, respectivamente. Os teores de proteínas médios de *C. vulgaris* e *M. contortum* em fotobiorreatores tubulares foram de 16,6% e 17,3%, respectivamente.

De acordo com Norma NBR 13.969 / 97 (Tanques sépticos - Unidades de tratamento complementar e disposição final dos efluentes líquidos - Projeto, construção e operação) a água residual obtida após o tratamento terciário foi de classe A e B de acordo aos parâmetros avaliados de DQO, concentração de nitrogênio e fósforo, pH e temperatura. Razão pela qual, esta água pode ser utilizada na lavagem de carros e outros usos que requerem o contato direto do usuário com a água, com possível aspiração de aerossóis pelo operador (classe A) e lavagens de pisos, calçadas e irrigação dos jardins, manutenção dos lagos e canais para fins paisagísticos (classe B).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, p. 3402–3410, 2011.
- AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 14th Ed. Arlington: AOAC, p. 1141, 1984.
- ARBIB, Z. et al. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. **Ecological Engineering**, v. 52, p. 143–153, 1 mar. 2013.
- ARBIB, Z. et al. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. **Water Research**, v. 49, p. 465–474, 2014.
- ASANO, T. et al. **Water reuse : issues, technologies, and applications**. McGraw-Hill, 2007.
- ASMARE, A. M.; DEMESSIE, B. A.; MURTHY, G. S. Investigation of Microalgae Co-Cultures for Nutrient Recovery and Algal Biomass Production from Dairy Manure. **Applied Engineering in Agriculture**, p. 335–342, 29 maio 2014.
- BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.
- BEIJERINCK, M. W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen nie-deren Algen. **Botanische Zeitung**, v. 47, p. 725–788, 1890.
- BLANK, C. E.; PARKS, R. W.; HINMAN, N. W. Chitin: a potential new alternative nitrogen source for the tertiary, algal-based treatment of pulp and paper mill wastewater. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2753–2766, 2016.
- BOUARAB, L.; DAUTA, A.; LOUDI, M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. **Water Research**, v. 38, n. 11, p. 2706–2712, jun. 2004.
- BRESAOLA, M. D. et al. Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, p. 1–9, 7 mar. 2019.
- BURRELL, R.; INNIS, W.; MAYFIELD, C. Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vulgaris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 281–283, out. 1984.
- CARMOUZE, J.-P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos : fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. Edgard Blucher, 1994.
- CARVALHO, J. C. M. de et al. Microalgae bioreactors. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (Ed.). **Algal Biorefineries: Cultivation of Cells and Products**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 557.
- CERÓN GARCÍA, M. C. et al. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3/5, p. 239–248, 2000.
- CHEN, T. et al. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial**

Technology, v. 39, n. 1, p. 103–107, 1 jun. 2006.

CHEN, Z. et al. Centralized water reuse system with multiple applications in urban areas: Lessons from China's experience. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 117, n. Part B, p. 125–136, 2017.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CHIU, S.-Y. et al. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015.

CHUDоба, J. Quantitative estimation in COD units of refractory organic compounds produced by activated sludge microorganisms. **Water Research**, v. 19, n. 1, p. 37–43, 1985.

COLE, A. J. et al. Adding value to the treatment of municipal wastewater through the intensive production of freshwater macroalgae. **Algal Research**, v. 20, p. 100–109, 2016.

CRUZ-MARTÍNEZ, L. C. et al. Growth and composition of *Arthrospira* (spirulina) *platensis* in a tubular photobioreactor using ammonium nitrate as the nitrogen source in a fed-batch process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 347–356, 2015.

DAYANANDA, C. et al. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 78–91, 2007.

DONG, T. et al. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 177, p. 879–895, 2016.

DUNSTAN, G. A. et al. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 1, p. 71–83, 1993.

EISELE, R.; ULLRICH, W. R. Effect of glucose and CO₂ on nitrate uptake and coupled OH⁻ flux in *Ankistrodesmus braunii*. **Plant Physiology**, v. 59, n. 1, p. 18–21, 1977.

ELGALLAL, M.; FLETCHER, L.; EVANS, B. Assessment of potential risks associated with chemicals in wastewater used for irrigation in arid and semiarid zones: A review. **Agricultural Water Management**, v. 177, p. 419–431, 2016.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for Water Reuse**.

ERIKSSON, E. et al. Characteristics of grey wastewater. **Urban Water**, v. 4, n. 1, p. 85–104, 2002.

FAROOQ, W. et al. Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. **Algal Research**, v. 8, p. 1–7, 2015.

FLORES, E.; HERRERO, A. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 1, p. 164–167, 2005.

GE, Y.; LIU, J.; TIAN, G. Growth characteristics of *Botryococcus braunii* 765 under high CO₂ concentration in photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 130–134, 2011.

GRADY, C. P. L. et al. **Biological wastewater treatment**. Third Edition ed. CRC Press, 2011.

GROBBELAAR, J. U. From laboratory to commercial production: a case study of a *Spirulina* (*Arthrospira*) facility in Musina, South Africa. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 523–527, 2009.

GUCKERT, J. B.; COOKSEY, K. E.; JACKSON, L. L. Lipid solvent systems are not equivalent for analysis of lipid classes in the microeukaryotic green alga, *Chlorella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 8, n. 3, p. 139–149, 1988.

HAMEED, Y. T. et al. A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to polyaluminum chloride, and application in a pilot plant. **Journal of Environmental Management**, v. 184, n. Part 3, p. 494–503, 2016.

HEREDIA-ARROYO, T. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 2245–2253, 2011.

HU, Q. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

IHLENFELDT, M. J. A.; GIBSON, J. Acetate uptake by the unicellular cyanobacteria *Synechococcus* and *Aphanocapsa*. **Archives of Microbiology**, v. 113, n. 3, p. 231–241, jun. 1977.

IMAN SHAYAN, S. et al. Hydraulic retention time effects on wastewater nutrient removal and bioproduct production via rotating algal biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 527–533, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. [s.l.: s.n.].

JL, M.-K. et al. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 142–148, 2013.

KNUCKEY, R. M. et al. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 300–313, 2006.

KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J. The systematics and ontogenesis of the genera *Ankistrodesmus* Corda and *Monoraphidium* gen. nov. **Studies in Phycology**, p. 75–144, 1969.

KONG, Q. et al. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 9–18, 2010.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOFF, K. et al. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. [s.l.] Wiley-VCH, 1999. p. 600.

LEE, S. J.; YOON, B.-D.; OH, H.-M. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Techniques**, v. 12, n. 7, p. 553–556, 1998.

LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 5, p. 749–756, 2008.

LIU, J. et al. Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). **Water Research**, v. 92, p. 61–68, 2016.

LOURENCO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas : princípios e aplicações**. [s.l.] Rima, 2006.

LU, Q. et al. Mitigating ammonia nitrogen deficiency in dairy wastewaters for algae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 33–40, 2016.

LUQUE DE CASTRO, M. .; GARCÍA-AYUSO, L. Soxhlet extraction of solid

materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 1998.

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 169–172, 2008.

MACKERETH, F. J. .; HERON, J.; TALLING, J. F. **Water analysis: some revised methods for limnologists**.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATSUDO, M. C. et al. Use of acetate in fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira platensis*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1721–1728, 2014.

MATSUDO, M. C. et al. Ethanol as complementary carbon source in *Scenedesmus obliquus* cultivation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 92, p. 781–786, 2017.

MATSUWAKI, I.; HARAYAMA, S.; KATO, M. Assessment of the biological invasion risks associated with a massive outdoor cultivation of the green alga, *Pseudochoricystis ellipsoidea*. **Algal Research**, v. 9, p. 1–7, 2015.

MCGINN, P. J. et al. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. **Photosynthesis Research**, v. 109, n. 1–3, p. 231–247, 2011.

MIRÓN, A. S. et al. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 287–297, 2003.

MOLINA GRIMA, E.; ACIÉ FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A. Downstream Processing of Cell-Mass and Products. In: AMOS RICHMOND (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 215–252.

MOLINO, A. et al. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 1–21, 2018.

MUJTABA, G.; LEE, K. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. **Water Research**, v. 120, p. 174–184, set. 2017.

MUTTAMARA, S. Wastewater characteristics. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 16, n. 1–4, p. 145–159, 1996.

NEVEUX, N. et al. The treatment of municipal wastewater by the macroalga *Oedogonium* sp. and its potential for the production of biocrude. **Algal Research**, v. 13, p. 284–292, 2016.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation – Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3–5, p. 207–218, 2000.

OLGUÍN, E. J. et al. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource**

Technology, v. 77, n. 1, p. 19–24, 2001.

ÓRPEZ, R. et al. Growth of the microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. **Desalination**, v. 246, n. 1–3, p. 625–630, 2009.

OSWALD, W. J. The coming industry of controlled photosynthesis. **American Journal of Public Health and the Nations Health**, v. 52, n. 2, p. 235–242, 1962.

OSWALD, W. J. Terrestrial approaches to integration of waste treatment. **Waste Management & Research**, v. 9, n. 5, p. 477–484, 1991.

OSWALD, W. J.; GOLUEKE, C. . Eutrophication trends in the United States: A Problem? **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 38, n. 6, p. 964–975, 1966.

PADMAPERUMA, G. et al. Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 690–703, 4 jul. 2018.

PELIZER, L. H. et al. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Revista de Farmácia e Química**, v. 32, n. 1, p. 37–40, 1999.

PELIZER, L. H. et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 371–375, 2003.

PÉREZ-MORA, L. S. et al. An investigation into producing *Botryococcus braunii* in a tubular photobioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 12, p. 3053–3060, 2016.

PESCOD, M. B. **Wastewater treatment and use in agriculture-FAO irrigation and drainage paper 47 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Rome, Italy. Ver. 47, 1992.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.-H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207–216, 1984.

PISAREVSKY, A. M.; POLOZOVA, I. P.; HOCKRIDGE, P. M. Chemical Oxygen Demand. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 101–107, 2005.

QADIR, M. et al. Environmental risks and cost-effective risk management in wastewater use systems. In: **Wastewater**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 55–72.

RADAKOVITS, R. et al. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 4, p. 486–501, abr. 2010.

RAJA, R. et al. A Perspective on the biotechnological potential of microalgae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 77–88, 2008.

RASOUL-AMINI, S. et al. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 126–131, 2014.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411–3424, 2011.

RODRIGUES, M. S. et al. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* and *Chlorella vulgaris*: Multi-metal systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217–218, p. 246–255, 2012.

RODRIGUES, M. S. et al. Ammonium feeding and pH influencing *Arthrospira platensis* growth, composition, and C- and N-uptake. **Chemical Engineering & Technology**,

v. 39, n. 9, p. 1700–1706, 2016.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 58–64, 2010.

RUIZ, G.; JEISON, D.; CHAMY, R. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. **Water Research**, v. 37, n. 6, p. 1371–1377, 1 mar. 2003.

SAHOO, D.; SECKBACH, J. **The algae world**. Netherlands: Springer, 2015.

SÁNCHEZ-LUNA, L. D. et al. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: A kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 702–711, 20 set. 2006.

SASSANO, C. E. N. et al. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1732–1738, 2010.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012.

SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J.; MUJUMDAR, A. S. Advances and challenges on algae harvesting and drying. **Drying Technology**, v. 33, n. 4, p. 386–394, 2015.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.

SILVA, J.; TORRES, P.; MADERA, C. Reuso de aguas residuales domésticas en agricultura. **Agronomía Colombiana**, v. 26, n. 2, p. 347–359, 2008.

SOEDER, C. J. Massive cultivation of microalgae: Results and prospects. **Hydrobiologia**, v. 72, n. 1–2, p. 197–209, 1980.

SOLOVCHENKO, A. et al. Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 550–564, 2016.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STARR, R. C.; ZEIKUS, J. A. UTEX – The culture collection of algae at the University of Texas at Austin 1993 List of cultures. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 2, p. 1–106, 1993.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. **A manual of sea water analysis (With special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material)**.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 896–907, 1 nov. 2011.

SUTHERLAND, D. L. et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water Research**, v. 70, p. 9–26, 2015.

SYDNEY, E. B. et al. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3291–3294, 2011.

TALUKDAR, J. Influences of dissolved inorganic carbon and nitrogen sources on

growth, total lipid content and calorific value of freshwater oleaginous microalga *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 61, n. 3, p. 14–25, 2012.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1109–1119, 2015.

TORZILLO, G.; CHINI ZITTELLI, G. Tubular Photobioreactors. In: BAJPAI, R.; PROKOP, A.; ZAPPI, M. (Ed.). **Algal Biorefineries**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015.

TRATA BRASIL. Saneamento e saúde. <http://tratabrasil.org.br/situacao-do-saneamento-no-brasil>. Acesso em 17/02/2015.

TRATA BRASIL. Saneamento e saúde. <http://tratabrasil.org.br/saneamento-no-brasil>. Acesso em 26/01/2016.

TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 178–214.

UDUMAN, N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, n. 1, 2010.

UMMALYMA, S. B. et al. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 216–221, 2016.

VON SPERLING, M. **Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal**. London: IWA Publishing, 2007.

VON SPERLING, M.; DE LEMOS CHERNICHARO, C. . **Biological wastewater treatment in warm climate regions**. [s.l.] IWA publishing, 2005.

WANG, C. et al. Total concentrations and fractions of Cd, Cr, Pb, Cu, Ni and Zn in sewage sludge from municipal and industrial wastewater treatment plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 119, n. 1–3, p. 245–249, 2005.

WANG, L. et al. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 1174–1186, 2010a.

WANG, L. et al. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2623–2628, 2010b.

WIENER, M. J.; JAFVERT, C. T.; NIES, L. F. The assessment of water use and reuse through reported data: A US case study. **Science of The Total Environment**, v. 539, p. 70–77, 2016.

XIN, L.; HONG-YING, H.; JIA, Y. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 59–63, 2010.

XU, L. et al. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178–189, 2009.

APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO MEIO BOLD (STARR; ZEIKUS, 1993)

Composição, por litro (de água destilada):

NaNO ₃ (25g/L).....	10mL
CaCl ₂ .2H ₂ O (2,5g/L).....	10mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (7,5g/L).....	10mL
K ₂ HPO ₄ (7,5g/L).....	10mL
KH ₂ PO ₄ (17,5g/L).....	10mL
NaCl (2,5g/L).....	10mL
*Solução de micronutrientes PIV.....	6mL
**Mix de vitamina.....	1mL

*Solução de micronutrientes PIV (em 1 litro de água destilada):

Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,750g
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,097g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,041g
ZnCl ₂	0,005g
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,004g

**Mix de Vitaminas (em 200mL de água destilada):

Vitamina B12 (Cianocobalamina).....	0,027g
Vitamina B8 (Biotina)	0,005g
Vitamina B1 (Tiamina)	0,220g