

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Estudo do reaproveitamento de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes
através de tratamento biológico.

Marcello Dapievi Bresaola

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

Estudo do reaproveitamento de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes
através de tratamento biológico.

Marcello Dapievi Bresaola

Versão corrigida da tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2023

Marcello Dapievi Bresaola

Estudo do reaproveitamento de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes
através de tratamento biológico.

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof.. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Orientador/presidente

1º. Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2023.

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

B842e Bresaola, Marcello Dapievi
 Estudo do reaproveitamento de meio de cultivo de
 microrganismos fotossintetizantes através de
 tratamento biológico / Marcello Dapievi Bresaola. -
 São Paulo, 2023.
 84 p.

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

1. Biotecnologia. I. T. II. Carvalho, João
Carlos Monteiro, orientador.

BRESAOLA, M. D. **Estudo do reaproveitamento de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes através de tratamento biológico**. 2023. 84 p. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2022.

A microalga *Ankistrodesmus braunii* é um microrganismo fotossintetizante capaz de produzir elevadas concentrações de lipídios e proteínas que podem ser utilizados pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Porém, como se trata de uma microalga, o seu cultivo em larga escala demanda a utilização de bastante água e sais para que se multipliquem em níveis satisfatórios. Este trabalho propõe uma metodologia de tratamento biológico desses meios de cultivo residuais, oriundos de um cultivo inicial, para viabilizar sua reutilização em cultivos posteriores evitando-se, assim, o desperdício de água e o descarte de sais e matéria orgânica no meio ambiente. Para obtenção de meio de cultivo residual de *Ankistrodesmus braunii* rico em matéria orgânica e pigmentos a ser tratado em diferentes condições experimentais para posterior reutilização em novo cultivo, esta microalga foi cultivada por processo semi-contínuo em meio de cultivo BOLD 3N em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, obtendo-se concentração de biomassa de $2358 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$. Foram realizados tratamentos biológicos do meio de cultivo residual por 72 horas, os quais consistiram em promover a multiplicação celular bacteriana presente em co-cultura com as microalgas, em temperaturas de 30 e 37 °C e vazões de aeração de 0,1 e 1,0 vvm. Foi possível constatar que houve remoção de matéria orgânica, medida pela absorbância do meio de cultivo a 254 nm (A_{254}) e pigmentos, medida pela absorbância do meio de cultivo a 440 nm (A_{440}) do meio residual, pelas bactérias presentes no meio de cultivo, independentemente da condição de tratamento, embora uma maior remoção de A_{254} tenha ocorrido a 37 °C e 1,0 vvm. Nessas condições, foi possível remover 67,8 % de matéria orgânica do meio de cultivo residual e 86,4% da quantidade de pigmentos. Pós-tratamentos realizados nos meios que sofreram tratamento biológico compreenderam somente centrifugação ou uso de carvão ativado em pó (CAP) seguido de centrifugação. A quantidade de matéria orgânica residual nos pós-tratamentos com CAP apresentou decréscimo linear até a concentração de 50 mg L^{-1} deste. Nestas condições, houve uma remoção de 27,5 % de matéria orgânica do meio tratado biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm, enquanto no pós-tratamento correspondente a apenas centrifugação a remoção de A_{254} foi de 7,9 %. Novos cultivos de *Ankistrodesmus braunii* foram feitos em agitadores rotativos com uso dos

meios de cultivo tratados nas diferentes condições avaliadas, não sendo possível observar variação do crescimento celular microalgal entre eles, obtendo-se uma concentração celular de $1352 \pm 46 \text{ mg L}^{-1}$. Esses valores de concentração celular foram iguais àqueles obtidos em cultivos realizados com meio BOLD 3N novo nas mesmas condições experimentais ($1338 \pm 32 \text{ mg L}^{-1}$). No meio não tratado, no entanto, não foi possível obter crescimento celular, o que indica a necessidade de tratamento do meio de cultivo proveniente de crescimento celular para que ele possa ser reutilizado no processo produtivo de cultivo desta microalga.

Palavras-chaves: microalgas, tratamento biológico, meio de cultivo residual, matéria orgânica, reuso.

ABSTRACT

BRESAOLA, M, D. **Study of the reuse of culture medium of photosynthetic microorganisms through biological treatment.** 2023. 84p. (Doctoral Thesis) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. 2022.

The microalgae *Ankistrodesmus braunii* is a photosynthetic microorganism capable of producing high concentrations of lipids and proteins that can be used by the food, cosmetic and pharmaceutical industries. However, as it is a microalga, its large-scale cultivation requires the use of plenty of water and salts for it to multiply at satisfactory levels. This work proposes a methodology for the biological treatment of these residual culture media, originating from an initial cultivation, to enable their reuse in subsequent cultivations, thus avoiding water waste and the disposal of salts and organic matter in the environment. To obtain residual culture medium of *Ankistrodesmus braunii* rich in organic matter and pigments to be treated under different experimental conditions for subsequent reuse in a new culture, this microalgae was cultivated by a semi-continuous process in BOLD 3N culture medium in a tubular photobioreactor using sodium nitrate as a source of nitrogen, obtaining a biomass concentration of $2,358 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$. Biological treatments of the residual culture medium were carried out for 72 hours, which consisted of promoting bacterial cell multiplication present in co-culture with the microalgae, at temperatures of 30 and 37 °C and aeration flow rates of 0.1 and 1.0 vvm. It was possible to verify that there was removal of organic matter, measured by the absorbance of the culture medium at 254 nm (A_{254}), and pigments, measured by the absorbance of the culture medium at 440 nm (A_{440}), from the residual medium by the bacteria present in the culture medium, regardless of treatment condition, although greater A_{254} removal occurred at 37°C and 1.0 vvm. Under these conditions, it was possible to remove 67.8% of organic matter from the residual culture medium and 86.4% of the amount of pigments. Post-treatments carried out in media that underwent biological treatment comprised only centrifugation or the use of powdered activated carbon (PAC) followed by centrifugation. The amount of residual organic matter in CAP post-treatments presented a linear decrease up to a concentration of 50 mg L⁻¹ of CAP. Under these conditions, there was a removal of 27.5% of organic matter from the biologically treated medium at 37 °C and 1.0 vvm, while in the post-treatment corresponding to only centrifugation the removal of A_{254} was 7.9%. New cultivations of *Ankistrodesmus braunii*

were carried out in a shaker using the culture media treated under the different evaluated conditions, and it was not possible to observe variation in microalgal cell growth between them, obtaining a cell concentration of $1,352 \pm 46 \text{ mg L}^{-1}$. These values of cell concentration were the same as those obtained in cultures performed with new BOLD 3N medium at the same experimental conditions ($1,338 \pm 32 \text{ mg L}^{-1}$). In the untreated medium, however, it was not possible to obtain cell growth, which indicates the need to treat the culture medium from cell growth so that it can be reused in the productive process of cultivation of this microalga.

Keywords: microalgae, biological treatment, residual culture medium, organic matter, reuse.

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Carlos Monteiro de Carvalho, pela orientação, ensinamentos e paciência durante a realização de todo o trabalho.

A professora Marina Ishii, pela grande colaboração prestada e fundamental para a realização deste trabalho.

A minha família, pelo apoio incondicional durante toda a minha trajetória na realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório pela companhia e apoio durante o programa de doutorado.

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

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	<i>Ankistrodesmus braunii</i> .	23
Figura 2.	Fluxograma de obtenção de meio de cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> a partir do seu cultivo semi-contínuo em fotobiorreator tubular e tratamentos para novo cultivo desta microalga em agitador rotativo.	35
Figura 3.	Reator de tratamento biológico.	36
Figura 4.	Amostras no interior do reator.	36
Figura 5.	Pós-tratamento com uso de CAP dos meios previamente tratados por processo biológico.	38
Figura 6.	Curva de calibração para determinação da concentração celular de <i>Ankistrodesmus braunii</i> .	41
Figura 7.	Curva de calibração para determinação da concentração de nitrogênio a partir de soluções padrão de nitrato de sódio.	43
Figura 8.	Curva de calibração para determinação da concentração de nitrogênio a partir de soluções padrão de cloreto de amônio.	44
Figura 9.	Concentração celular (X) de <i>Ankistrodesmus braunii</i> Em função do tempo (dias) do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando meio BOLD 3N em fotobiorreator tubular.	46
Figura 10.	Meio residual.	52
Figura 11.	Meio com 24 horas de tratamento biológico.	52
Figura 12.	Abs ₂₅₄ em função da concentração de CAP.	62
Figura 13.	Figura 13. Abs ₂₅₄ em função da Concentração de CAP, evidenciando a linearidade da queda da quantidade de matéria orgânica para concentração de CAP até 50 mg L ⁻¹ (R ² = 0,9814).	63

- Figura 14.** Amostras de meio BOLD 3N residual e meios BOLD 3N tratados em diferentes temperaturas e aerações submetidos a centrifugação. 72
- Figura 15.** Amostras de meio BOLD 3N residual e meios BOLD 3N tratados em diferentes temperaturas e aerações submetidos a tratamento com CAP seguido de centrifugação. 72
- Figura 16.** Amostras de meio BOLD 3N residual, meio BOLD 3N novo e BOLD 3N tratados a 30 °C e 0,1 vvm após cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotativo no dia 7. 72

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Valores de absorvância nas amostras brutas (Abs_{254b} e Abs_{440b}) e filtradas (Abs_{254f} e Abs_{440f}) de meio de cultivo proveniente de cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> tratado biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm.	49
Tabela 2. Determinação da concentração celular bacteriana (UFC mL ⁻¹) e pH ao longo do tempo de meio de cultivo proveniente de cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> tratado biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm.	51
Tabela 3. Planejamento experimental dos ensaios principais, correspondentes aos diferentes tratamentos biológicos a que os meios residuais de crescimento de <i>Ankistrodesmus braunii</i> foram submetidos para remoção de matéria orgânica e pigmentos.	53
Tabela 4. Meio residual constituído da mistura dos meios finais (tempo correspondente a 72 horas) submetidos aos diferentes tratamentos biológicos.	56
Tabela 5. Valores finais médios, em tempo correspondente a 72 horas, de concentração celular bacteriana, valor de pH, concentração de cloreto de amônio e de nitrato de sódio nos meios provenientes de cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> submetidos a diferentes tratamentos biológicos.	59
Tabela 6. Determinação da concentração de CAP a ser usada no pós-tratamento.	62
Tabela 7. Resultados de pós-tratamento (valor de pH, concentração celular bacteriana, matéria orgânica, pigmentos, nitrato de sódio, cloreto de amônio) por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 30 °C e 0,1 vvm.	64
Tabela 8. Resultados de pós-tratamento (valor de pH, concentração celular bacteriana, matéria orgânica, pigmentos, nitrato de	65

sódio, cloreto de amônio) por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 30 °C e 1,0 vvm.

- Tabela 9.** Resultados de pós-tratamento (valor de pH, concentração celular bacteriana, matéria orgânica, pigmentos, nitrato de sódio, cloreto de amônio) por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 37 °C e 0,1 vvm. 65
- Tabela 10.** Resultados de pós-tratamento (valor de pH, concentração celular bacteriana, matéria orgânica, pigmentos, nitrato de sódio, cloreto de amônio) por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 30 °C e 1,0 vvm. 66
- Tabela 11.** Concentração de biomassa (mg L^{-1}) dos cultivos de *Ankistrodesmus braunii* em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a diferentes padrões (Ensaio NT, B1 e B2) e tratamentos biológicos (Ensaio S1 a S8). 71

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

CAP	Carvão ativado em pó.
DQO	Demanda química de oxigênio.
°C	Graus celsius.
pH	Potencial hidrogeniônico.
rpm	Revoluções por minuto.
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto.
Px	Produtividade em célula.
Xm	Concentração celular máxima.
Abs _{254b}	Absorbância de 254 nanômetros de amostra bruta
Abs _{254f}	Absorbância de 254 nanômetros de amostra filtrada
Abs _{440b}	Absorbância de 440 nanômetros de amostra bruta
Abs _{440f}	Absorbância de 440 nanômetros de amostra filtrada

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. <i>Ankistrodesmus braunii</i>	23
2.2. Condições de cultivo de microrganismos fotossintetizantes.	24
2.3. Reaproveitamento de meio.	27
2.4. Propriedades dos tratamentos biológicos de efluentes.	29
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Obtenção de meio de cultivo residual de <i>Ankistrodesmus braunii</i>.	32
4.1.1. Microrganismo e meio de cultivo.	32
4.1.2. Preparação de inóculo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> .	33
4.1.3. Condições de cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> para obtenção de meio residual.	33
4.2. Tratamentos dos meios residuais do cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i>.	34
4.2.1. Tratamentos biológicos isoladamente.	36
4.2.2. Pós-tratamento com carvão ativado em pó (CAP) do meio que sofreu tratamento biológico.	37
4.2.2.1. Ensaio preliminar para a escolha da concentração de CAP a ser utilizada no tratamento dos meios tratados biologicamente para remoção adicional de matéria orgânica e pigmentos.	37
4.2.2.2. Tratamento com CAP realizado nos meios residuais tratados biologicamente para uso em novo cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i>	38
4.2.3. Correção dos valores de pH e das concentrações de nitrato de sódio dos meios submetidos a tratamento biológico	39

com tratamento posterior com CAP para cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> em agitador rotativo.	
4.3. Cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> em agitador rotativo utilizando meios de cultivo submetidos a tratamento biológico e pós-tratamento.	39
4.4. Técnicas Analíticas.	40
4.4.1. Determinação da concentração celular de <i>Ankistrodesmus braunii</i> .	40
4.4.2. Determinação da concentração celular das bactérias provenientes dos meios de cultivo residuais e tratados.	41
4.4.3. Determinação do teor de matéria orgânica e pigmentos.	41
4.4.4. Acompanhamento dos valores de pH.	42
4.4.5. Determinação do teor de nitrato.	42
4.4.6. Determinação do teor de amônia.	43
4.4.7. Determinação da produtividade em células de <i>Ankistrodesmus braunii</i> .	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> Em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo para produção de meio residual.	45
5.2. Tratamento biológico.	47
5.2.1. Determinação do tempo de tratamento biológico.	48
5.2.2. Determinação da concentração celular bacteriana e pH nos diferentes intervalos de tempo de tratamento biológico.	50
5.2.3. Planejamento experimental dos ensaios principais.	52
5.2.3.1. Remoção de matéria orgânica e pigmentos.	54
5.2.3.2. Crescimento bacteriano, aumento de pH, concentrações de amônia e nitrato de sódio ao final dos ensaios principais de tratamento biológico.	57
5.2.4. Pós-tratamento	60
5.2.4.1. Centrifugação	60

5.2.4.2. Tratamento com CAP - Teste preliminar para verificar a eficiência de remoção de matéria orgânica e pigmentos.	61
5.2.4.3. Resultados dos pós-tratamentos.	63
5.2.5. Cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i> em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a tratamento biológico.	66
5.2.5.1. Ajustes dos meios de cultivos tratados e padrões.	67
5.2.5.2. Resultados dos cultivos de <i>Ankistrodesmus braunii</i> em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a tratamento biológico e padrões.	68
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

Microalgas e cianobactérias, denominados ao longo deste trabalho como microrganismos fotossintetizantes, possuem requerimentos nutricionais relativamente simples para se multiplicarem (ANDRADE & COSTA, 2008), são excelentes fixadores de gás carbônico (BROWN & ZEILER, 1993) e são promissores no que diz respeito à produção de biomassa rica em elementos valiosos para uso humano e animal, assim como para a produção de biocombustível. Apresentam estabilidade em sua constituição bioquímica (SASSANO et al., 2010) pois podem ser cultivadas em condições controladas, fato que facilitaria este tipo de cultivo na indústria. Dos elementos que esta classe de microrganismos produz, podem ser destacadas principalmente as proteínas e os lipídios, e constituem-se também importantes compostos comercializados os carotenóides, polissacarídeos, ficobilinas, vitaminas, ácidos graxos, esteróides, dentre outras substâncias com atividade biológica (WISNIAK & KORIN, 2005; GOHARA-BEIRIGO et al., 2022). Particularmente, a microalga *Ankistrodesmus braunii* é uma grande produtora de lipídios, os quais poderiam ser empregados em suplementação de nutrientes para humanos, podendo ser citados os ácidos graxos poli-insaturados e os pigmentos, como luteína, astaxantina, β -caroteno, derivado de neoxantina, os quais apresentam propriedades antioxidantes (WILLIAMS & MCMILLAN, 1961). De acordo com Spolaore et al. (2006), a produção de biomassa de microrganismos fotossintetizantes tem se tornado cada vez mais frequente devido às vantagens de seu cultivo e das propriedades dessa biomassa, já sendo ela produzida em grande escala em muitos países ao redor do mundo. Atualmente, a produção anual de microalgas supera as 56.000 toneladas (CAI et al., 2021).

Ankistrodesmus braunii pode produzir até 73% de lipídios de sua biomassa seca, estando os ácidos linolênico e oleico presentes nessa fração lipídica. Em cultivos em processo semi-contínuo em fotobiorreatores utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, foram alcançados valores de até 39% de lipídios de sua biomassa seca quando do emprego de concentrações de 2 e 5 mM deste nutriente, não sendo observadas perdas deste componente celular nas células mesmo com o emprego de concentrações de nitrato de sódio de 10 e 20 mM, com teores de lipídios chegando a valores da ordem de 38% nas biomassas obtidas nestas condições experimentais,

podendo-se ressaltar mais uma vez a capacidade desse microrganismo de ser usado como produtor de lipídios de alto valor agregado (BRESAOLA et al., 2019). Devido à mudança dos hábitos alimentares nos últimos anos e, conseqüentemente, do aparecimento de doenças em decorrência muitas vezes da carência da ingestão desses compostos, torna-se essencial o estudo de vias alternativas para a produção dos mesmos, já que a demanda por estes nutrientes, como os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, tem aumentado (SALEM & EGGERSDORFER, 2015).

Diversos processos de cultivo podem ser empregados para a produção de microrganismos fotossintetizantes, sendo que cada processo depende do metabolismo da célula a ser cultivada e também do resultado que se deseja alcançar. Os cultivos podem ser feitos em fotobiorreatores fechados ou abertos, e os tipos de processo de cultivo podem ser batelada, batelada alimentada, semi-contínuo, entre outros. Cada tipo de processo possui suas vantagens e desvantagens e os meios de cultura também podem variar em sua composição, pois cada célula possui uma demanda específica de nutrientes, bem como de salinidade e valor de pH adequados para seu crescimento (RODRIGUES et al, 2011). *Ankistrodesmus braunii* cresce bem em meio com salinidade baixa, sendo $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl (SALAMA et al., 2013) e pH de $7,0 \pm 0,5$, próximo ao neutro (BRESAOLA et al., 2019), sendo o meio BOLD 3N um dos mais adequados para sua preservação e cultivo.

Um dos grandes desafios para se produzir elevadas quantidades de biomassa de microrganismos fotossintetizantes é devido ao fato de ser necessária uma alta demanda de recursos hídricos e sais para a produção de meio de cultura, uma vez que podem ser utilizados fotobiorreatores da ordem de 5000 m^3 de capacidade (FLORES et al., 2003). Além do elevado consumo de água, uma grande quantidade de sais componentes do meio de cultura também necessita ser utilizada, sendo importante o tratamento desse meio processado pós-cultivo tanto para impedir o descarte de grande volume de água, que poderia ser reutilizado, quanto dos sais e matéria orgânica residual no meio ambiente, o que poderia causar grande impacto ambiental como a eutrofização de corpos hídricos. De fato, a preservação desses recursos de extrema importância na atualidade, pois as mudanças climáticas e o crescimento acelerado dos grandes centros urbanos vem contribuindo para a escassez de água. Em virtude de todos esses fatos, somos conduzidos a desenvolver técnicas para a reutilização de

meios de cultivo, de forma que o processo de produção de microalgas seja sustentável. (CAMARGO DE JESUS, 2016).

Cultivos de microrganismos fotossintetizantes, em sua grande maioria, não são axênicos devido à dificuldade de se executar um cultivo deste tipo com ausência de outra gama de diferentes microrganismos no meio, destacando-se principalmente as bactérias, já que estas podem se beneficiar de nutrientes presentes no meio provenientes de morte celular ou até mesmo de compostos excretados pelos organismos fotossintetizantes. Esta associação entre microrganismos é extremamente comum de se observar e de acordo com Kuentzel (1969), trabalhos na literatura indicam que a simbiose microalga-bactéria pode ser responsável pelo rápido crescimento das próprias microalgas. A matéria orgânica liberada por microrganismos fotossintetizantes durante seu ciclo de vida é utilizada pelas bactérias que estão no mesmo meio, com geração de CO₂, o qual, por sua vez, é utilizado pela microalga, favorecendo sua rápida multiplicação. Esta matéria orgânica liberada por microrganismos fotossintetizantes pode ser constituída por aminoácidos, peptídeos, açúcares, poliálcoois, enzimas e ocasionalmente vitaminas, sendo todos estes elementos os responsáveis pela multiplicação bacteriana (FOGG, 1966). Este fenômeno de simbiose pôde ser verificado por Grossart et al. (2006), onde estes autores realizaram experimentos envolvendo cultivo de diatomáceas marinhas e bactérias de vida livre, gerando resultados onde foi constatado que o material orgânico eliminado pela diatomácea, e que estava dissolvida no meio de cultivo, foi largamente consumido por estas bactérias ali presentes. O consumo de compostos orgânicos de *Chlorella* por bactérias também foi observado por Cole (1982), o que evidencia que este tipo de associação é comum no ambiente marinho, demonstrando o potencial de capacidade de biodegradação dessas bactérias e que elas são usualmente associadas a microrganismos fotossintetizantes.

Este potencial para a decomposição de matéria orgânica por bactérias poderia ser usado para promover a remoção deste material do meio de cultivo residual de microalgas, permitindo seu reuso em futuros cultivos. Além disso, a biomassa bacteriana remanescente do processo de tratamento do meio dos microrganismos fotossintetizantes poderia ser separada e utilizada na agricultura como fertilizante biológico, já que apresenta potencial como fonte de matéria orgânica nas lavouras, fornecendo nitrogênio, o qual é essencial para o crescimento e desenvolvimento de

plantas como a soja, feijão e cana de açúcar. (FUSINATO, et al., 2013). As proteínas presentes nesta matéria orgânica bacteriana seriam degradadas pela ação de bactérias saprófitas e fungos presentes no solo, gerando amônia que posteriormente é assimilada pelas plantas, favorecendo seu desenvolvimento (HOPKINS & HUNER, 2009). Os biofertilizantes possuem grandes vantagens em comparação aos fertilizantes inorgânicos, pois estes são produzidos a partir de fontes não renováveis além de ter potencial para alterar o pH do solo com o seu uso a longo prazo, impactando em todo o ecossistema ali presente. Outra utilidade destas bactérias remanescente do processo de tratamento do meio seria usá-las como proteção contra patógenos de plantas cultivadas na agricultura, assim como proteção contra condições adversas do ambiente. Biofilmes produzidos por esta população de bactérias podem agir como barreira física contra a ação de bactérias e fungos patogênicos na lavoura, assim como regular a disponibilidade de água e nutrientes, pois têm capacidade de reter estes elementos (RAFIQUE et al., 2015). Esta poderia ser uma forma alternativa aos métodos usados na atualidade, além de ser uma forma segura e eficaz de controle de pragas nas plantações, pois a maior parte dos pesticidas utilizados podem ser tóxicos e prejudicar a saúde daqueles que os manipulam como formuladores, pulverizadores e trabalhadores agrícolas (AKTAR et al., 2009).

Estudos de tratamento para reuso de meio de cultivo de *Arthrospira platensis* já foram avaliados em trabalhos recentes na literatura, envolvendo processos físicos e químicos para tal finalidade. Morocho-Jácome et al. (2015a) utilizaram processo físico-químico de floculação e adsorção para tratar meio de cultivo processado de *Arthrospira platensis*, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas de tratamento em que foi possível promover a remoção de matéria orgânica e pigmentos, possibilitando o reuso deste meio tratado em novos cultivos. Nesse estudo, os autores trabalharam com otimização pela metodologia de superfície de resposta, sendo realizado um processo inicial de coagulação de componentes orgânicos do meio de cultivo proveniente de crescimento da cianobactéria com uso de cloreto férrico (F) (concentrações de 3,3 a 16,7 mg L⁻¹) seguido de adsorção em coluna com carvão ativado granulado (CAG) (concentrações de 24,7 a 75,3 g L⁻¹), com tempos de residência (T) de 13,1 a 46,9 minutos. Nas condições otimizadas ($CAG = 54,2$ g L⁻¹; $F = 10$ mg L⁻¹; $T = 30,8$ minutos), foi possível remover 90 % da matéria orgânica (quantificada pela Absorbância a 254 nm- A_{254} - do meio de cultivo tratado) e 93 0%

dos pigmentos (quantificados pela Absorbância a 440 nm – A_{440} – do meio de cultivo tratado). Esse tratamento associando processo químico (coagulação) seguido de processo físico (adsorção) em coluna foi eficiente, mas foi igualmente possível obter resultados ótimos com uso simultâneo de carvão ativado em pó (CAP) combinado com cloreto férrico sob diferentes tempos de tratamento (MOROCHO-JÁCOME et al., 2016a), sendo que em condições ótimas de tratamento do meio de cultivo proveniente do cultivo da *A. platensis* ($CAP = 24,4 \text{ mg L}^{-1}$; $F = 20,3 \text{ mg L}^{-1}$; $T = 30,4$ minutos) foi possível remover $92,3 \pm 0,6\%$ de matéria orgânica (remoção de A_{254}) e $95,3 \pm 0,6\%$ dos pigmentos presentes no meio de cultivo (remoção de A_{440}). Adicionalmente, o cultivo desta cianobactéria no meio tratado proporcionou um crescimento celular 134 % maior que aquele realizado em meio padrão novo, bem como 124 % maior que aquele realizado no meio sem tratamento, porém com correção da concentração inicial da fonte de nitrato de sódio para valor correspondente a meio padrão novo ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), demonstrando a vantagem do tratamento para novos cultivos celulares. O tratamento com carvão ativado em pó em combinação com sulfato férrico (S) em vez de cloreto férrico sob diferentes tempos não proporcionou remoção tão significativa de matéria orgânica e pigmentos do meio de cultivo proveniente de cultivo prévio da *A. platensis* (MOROCHO-JÁCOME et al., 2016b). De fato, em condições ótimas de tratamento ($CAP = 40,0 \text{ mg L}^{-1}$; $S = 20,3 \text{ mg L}^{-1}$; $T = 36,1$ minutos), as remoções de matéria orgânica e pigmentos foram da ordem de 68 % e 61 %, respectivamente. No entanto, apesar da menor remoção destes compostos, o crescimento celular no meio tratado nestas condições foi, em média, 125 % maior que aquele em que se empregou meio novo de cultivo, bem como possibilitou uma economia de 94 % no tocante ao preparo do meio de cultivo.

Os tratamentos dos meios de cultivo utilizados previamente podem ser por processos descontínuos, como apresentados anteriormente, ou por processo contínuo. Assim, Morocho-Jácome et al. (2015b) trabalharam simultaneamente com processo contínuo de tratamento de meio de cultivo e processo contínuo de cultivo de *A. platensis* e demonstraram a exequibilidade de tal procedimento, em que foi possível obter a mesma concentração celular em regime estacionário com a reutilização do meio de cultivo, tratado somente com filtração em coluna de carvão ativado granular, na proporção de 50% na mistura com meio novo.

Uma abordagem que tem sido estudada e aplicada em processos industriais envolvendo purificação de água e tratamentos de águas residuárias é a separação por membranas (MIERZWA et al., 2008; XIAO et al., 2019; ZHANG et al., 2023), pois apresenta alta eficiência, dimensões reduzidas e estabilidade do efluente (LIU et al., 2022). Isso tem sido permitido devido a uma diminuição do custo da tecnologia de filtração tangencial, contando a seu favor também a facilidade de automação do processo, bem como da ampliação, uma vez que se baseia na inserção de novos módulos de filtração no sistema de tratamento. Visando avaliar processos de tratamento de meio residual com membranas, Camargo de Jesus (2016) usou métodos de microfiltração e ultrafiltração de meio residual de *Arthrospira platensis* para remoção de matéria orgânica e pigmentos com vistas ao reuso em novos cultivos desta cianobactéria. Assim, avaliou 3 porosidades de membrana (0,22 μm , 0,65 μm e 5000 Daltons), utilizando pressões transmembrana que variaram de 22,5 até 90 kPa. As remoções de materiais dos meios tratados com microfiltração foram maiores para os pigmentos (remoção de A_{440} de $93,1 \pm 1,1$ %) do que para matéria orgânica (remoção de A_{254} de $53,9 \pm 1,3$ %). Nos ensaios com ultrafiltração, que foram precedidos por um tratamento com microfiltração (0,22 μm e 22,5 kPa), não se observou uma melhora significativa do processo, com remoções de matéria orgânica de $57,2 \pm 0,5$ % e de pigmentos de $94,0 \pm 0,8$ %. Os cultivos desta cianobactéria em agitador rotativo a 156 ± 10 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 29 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ nos meios tratados com membrana de 0,65 μm e pressão transmembrana de 22,5 Kpa, com correções dos nutrientes carbonato, fostato e nitrato, levaram a uma concentração celular máxima igual a $3589,6 \pm 80$ mg L^{-1} , que foram estatisticamente iguais aos cultivos padrão, onde foram utilizados meios novos.

Apesar dos estudos com diversos tratamentos físicos e/ou químicos serem efetivos para possibilitar o reuso do meio de cultivo de microalgas, estudos envolvendo outras metodologias de tratamento mais baratas e simplificadas como tratamentos biológicos que usam microrganismos presentes naturalmente no cultivo de microalgas, as quais podem degradar matéria orgânica provenientes das próprias microalgas em questão, ainda são escassos na literatura, o que leva à necessidade de um maior número de estudos que busquem avaliar estes processos já que eles se tornam, a cada dia que passa, mais necessários para se alcançar maior sustentabilidade para a produção de biomassa de organismos fotossintetizantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Microrganismos fotossintetizantes como microalgas e cianobactérias tem demonstrado cada vez mais através de vários estudos, ao longo dos anos, seu potencial como fonte renovável e mais sustentável de diversos produtos de interesse para consumo humano como proteínas, lipídios, vitaminas, pigmentos, entre outros (COHEN, 1997). A produção comercial de biomassa de microalgas aumentou no último século (BOROWITZKA, 2013; D'ALESSANDRO & ANTONIOSI FILHO, 2016; RUIZ et al. 2016) e isso se deve à alta eficiência destes microrganismos, sendo ele o fator mais levado em consideração quando se busca lançar mão do cultivo desta classe de organismos para produção de bioprodutos, justamente por se conseguir alcançar alta produtividade dos compostos de interesse numa menor área, consumindo menos tempo e sob condições de cultivo mais controladas quando comparado a cultivo de plantas para obtenção dos mesmos produtos, por exemplo.

O acúmulo de bioprodutos de interesse por estes microrganismos pode ser melhor controlado quando comparado àqueles em que utilizam outros organismos fotossintetizantes, como plantas, por exemplo, justamente pelo fato de que se pode ajustar temperatura, pH, intensidade luminosa e adição de nutrientes em espaços e intervalo de tempo menores, tornando o processo de cultivo mais ágil, podendo-se alcançar produtividades elevadas nessas condições específicas. O fato de que não há dependência das condições climáticas para o crescimento de microalgas e cianobactérias também é um fator positivo já que se pode simular com precisão as condições ideais de crescimento dos mesmos dentro dos reatores sem que haja interferência externa.

Outra vantagem do cultivo de microrganismos fotossintetizantes é o fato de se poder utilizar dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica e/ou outros processos industriais para favorecer o cultivo dos mesmos, pois estes organismos, no processo de fotossíntese, utilizam ele como fonte de carbono, de forma que o dióxido de carbono adicionado ao fotobiorreator ao longo do cultivo para sustentar o crescimento celular mantém o valor de pH controlado (BRESAOLA et al., 2019). Algumas espécies possuem capacidade para crescer em até mesmo meios com elevadas concentrações de matéria orgânica (FIORESI et al., 2008) e a ausência de uso de solo para produção de biomassa fotossintetizante também pode ser considerada como vantagem já que evita problemas

como erosão e contaminação do ambiente (MAIER, et al., 2000), bem como a possibilidade de serem cultivadas em uma área menor.

Portanto, o uso de grandes quantidades de meio de cultivo necessários para a produção de altas concentrações de biomassa de microrganismos fotossintetizantes demanda um cuidado quanto ao consumo de água e descarte de nutrientes e matéria orgânica residual que irá ser produzido ao final de cada ciclo de cultivo, fato que chama atenção para a implementação de metodologias de tratamento para viabilizar o reuso destes meios residuais. Com isso, será possível reduzir consumo de água e reduzir a poluição do meio ambiente.

2.1. Ankistrodesmus braunii

A microalga *Ankistrodesmus braunii* é um microrganismo fotossintetizante unicelular (Figura 1), possuindo tamanho médio de 20 a 56 μm de comprimento e 5 a 8 μm de largura, apresentando formato fusiforme e alongado com extremidades obtusas. (JOHN et al., 2002). São células encontradas predominantemente em água doce, ou seja, com baixas salinidade e em temperaturas mais frias de regiões como América do Norte, Argentina, Iraque, Taiwan, Austrália. (GUIRY & GUIRY, 2015).

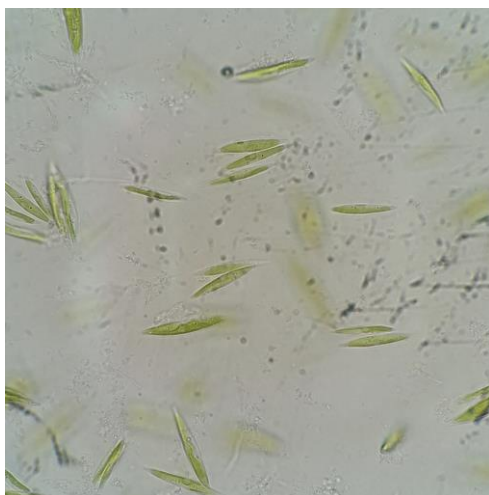


Figura 1. Foto de *Ankistrodesmus braunii*.

(Fonte: Elaborado pelo autor.)

Este microrganismo específico tem demonstrado grande potencial na produção de proteínas e lipídios, principalmente no que se diz respeito aos ácidos graxos sendo os ácidos palmítico, oleico e linolênico os encontrados em maiores concentrações em sua biomassa (WILLIAMS & McMILLAN, 1961). Além disso, demonstrou também através de estudos experimentais, que mantém produtividade estável dessas proteínas e lipídios totais quando cultivada em condições ideais de temperatura, pH, processo de cultivo e uso de meio de cultivo com concentrações de fonte de nitrogênio apropriadas. (BRESAOLA et al., 2019).

2.2. Condições de cultivo de microrganismos fotossintetizantes

O cultivo de microrganismos fotossintetizantes depende do uso de um meio de cultivo rico em nutrientes que atendam às necessidades metabólicas para sobrevivência e multiplicação dos mesmos. Meios de cultivo ricos em sais minerais que fornecem nitrogênio, fósforo e potássio como principais nutrientes além de água, traços de metais e vitaminas são essencialmente os empregados para a produção de biomassa de microrganismos fotossintetizantes.

O nitrogênio é o segundo elemento que se apresenta em maior quantidade na composição celular, devendo ser adicionado incondicionalmente ao meio de cultivo já que influencia diretamente tanto no crescimento de microrganismos fotossintetizantes quanto na composição da biomassa (GOLDMAN et al., 1982), quando se diz respeito aos teores de proteínas, lipídios, pigmentos e outros compostos (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980; DANESI et al. 2004; DANESI et al., 2002; NAES & POST, 1988; PIORRECK et al., 1984; STANCA & POPOVIC, 1996). No caso da microalga *Ankistrodesmus braunii*, por ser um microrganismo que se desenvolve melhor em meios pouco salinos e com pH mais próximos de valores neutros, utiliza-se o meio BOLD 3N (BRESAOLA et al., 2019), com 3 vezes mais fonte de nitrogênio em sua composição, como meio principal para manutenção e multiplicação dessa célula.

Temperaturas ideais são importantes para serem aplicadas nos cultivos de microrganismos fotossintetizantes, pois possuem influência direta nas taxas de crescimento celular e produtividade de componentes específicos de biomassa como proteínas, lipídios e outros compostos (COLLA et al., 2007) Estes efeitos ocorrem pela

ação direta da temperatura nos componentes celulares e relação dos coeficientes com a taxa de reação (FAINTUCH, 1989).

O ajuste do valor de pH também é importante durante o processo de cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular já que durante a fase de crescimento celular do microrganismo há aumento do valor de pH e essa alcalinização do meio, por conta dos metabólitos resultantes do crescimento celular, acaba por desfavorecer a continuidade da sua multiplicação. Como método de correção desse valor de pH, o uso de aeração com dióxido de carbono em intervalos de tempo se mostrou eficiente para isso e dar continuidade ao cultivo de *Ankistrodesmus braunii*. (BRESAOLA et al., 2019).

As condições de exposição a luminosidade também são fatores de grande importância no cultivo de microalgas e cianobactérias, pois afetam diretamente a produtividade e composição da biomassa destes microrganismos (OLGUÍN et al., 1997). Se submetidos a cultivos em baixa luminosidade, isso pode diminuir a velocidade de crescimento (BALLONI et al., 1980), em contrapartida, o excesso de iluminação pode levar a efeitos de foto-inibição e foto-oxidação, ambos podendo levar a inibição de crescimento e morte celular (JENSEN & KNUTSEN, 1993).

Como dispositivo de cultivo, existem diversos tipos de biorreatores que podem ser empregados para cultivar microrganismos fotossintetizantes. Neles, reações bioquímicas são catalisadas pelas células vivas ali presentes e como resultado, bioprodutos são sintetizados (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Duas grandes categorias de fotobiorreatores são largamente utilizados nos processos para produção de biomassa de microalgas e cianobactérias a nível industrial (LEE, 2001), e são eles os fotobiorreatores abertos e fechados. Sistemas abertos são mais práticos de operar, além de terem custo de operação menor e possibilitar cultivos com volumes maiores, sendo os mais utilizados, e são constituídos em sistemas de tanques agitados geralmente por pás. Já os sistemas fechados geralmente são constituídos por tubos fechados e o volume do cultivo impulsionado por bombeamento. Reduzem o efeito de sombreamento em altas concentrações celulares, há possibilidade de maior controle de contaminação externa e garante maior qualidade dos bioprodutos produzidos (BENNER, et al., 2022). A escolha entre um ou outro vai depender do tipo de microrganismo a ser cultivado, se deseja maior eficácia de produtividade de biomassa e qual tipo de bioproduto que se deseja obter.

Já com relação ao processo de cultivo, existem diversos tipos que podem ser empregados para obtenção de biomassa microbiana. Dentre eles pode-se citar processo descontínuo, descontínuo alimentado, semi-contínuo e contínuo, sendo também a escolha de cada um deles baseada no microrganismo a ser cultivado e tipo de bioproduto a ser produzido.

O processo descontínuo é o que apresenta operação mais simplificada, e nele se adiciona meio de cultivo em um reator seguido de inoculação de um microrganismo que se deseja cultivar, mantendo estáveis outras condições necessárias para o desenvolvimento do mesmo como correção de pH e adição de gás, por exemplo. Ao final do processo de fermentação, o meio fermentado e as células remanescentes são retirados do sistema e seguem pro processo final de isolamento das substâncias de interesse produzidas (CARVALHO & SATO, 2001).

O processo descontínuo alimentado se diferencia do descontínuo somente pelo fato de que nesse há adição de nutrientes não somente no começo do processo como no decorrer do mesmo dentro de intervalos de tempo pré-estabelecidos (RODRIGUES et al., 2010). Com isso, se consegue aumento do rendimento do processo pois se consegue estabelecer maior controle do metabolismo microbiano (CARVALHO & SATO, 2001; CARVALHO et al., 2004).

Já o processo semi-contínuo é aquele no qual após o término de um ciclo de um processo clássico descontínuo há a remoção de um volume de meio residual quando se atinge concentração celular máxima e logo em seguida é adicionado o mesmo volume de meio novo restaurando-se a concentração celular inicial do processo. Com isso, é possível otimizar o tempo do processo como um todo já que as células presentes no meio fermentado dentro do reator já estão metabolicamente adaptadas ao meio e reator, portanto ao se adicionar um volume de meio novo há um pico de crescimento exponencial, diminuindo a fase “lag” que ocorre tradicionalmente nos outros processos. (BORZANI, 2001). Este método se mostrou muito eficiente no cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular do tipo “ar-lift” justamente por reduzir fase “lag” nos ciclos de cultivos subsequentes à batelada. (BRESAOLA et al., 2019).

Após a realização dos cultivos, existe a necessidade de processo de separação da biomassa de microrganismos fotossintetizantes obtidas do meio de cultivo residual resultante, sendo denominado, colheita. Os métodos de colheita são, de início, uma

primeira etapa importantes para que a reciclagem do meio de cultivo seja possível e benéfica (ROCHA et al., 2014) e muitos outros processos foram testados e discutidos na colheita de microalgas, como centrifugação, filtração, flotação, separação magnética, floculação (WU et al., 2012), mudança de pH ou associação entre duas ou mais técnicas (KIM et al., 2011; LEE et al., 2014; DELRUE et al., 2015 ; TAN et al., 2015; DELATTRE et al., 2016; KHANRA et al., 2018).

2.3. Reaproveitamento de meio de cultivo

O cultivo de microalgas e cianobactérias utilizando meio de cultivo apropriado para promover seu crescimento celular resulta, automaticamente, no consumo dos nutrientes ali presentes e produção de matéria orgânica residual que se origina de metabólitos excretados para o meio e lise celular. Além da diminuição da concentração de nutrientes, que naturalmente ocorre pelo consumo do próprio microrganismo e é inibitório para a continuidade do crescimento dele, o acúmulo de matéria orgânica no meio também tem influência direta e é um dos principais motivos que causa inibição do crescimento de microalgas e cianobactérias por alteração das propriedades físico-químicas da água, como sua viscosidade, que poderia causar efeito de sombreamento, inibição da absorção de nutrientes e das trocas gasosas (LOFTUS & JOHNSON, 2017). Sendo assim, o uso de meio de cultivo novo ou tratado torna-se essencial para novos cultivos.

Em decorrência das grandes vantagens de se produzir biomassa microbiana de microrganismos fotossintetizantes como alternativas mais sustentáveis e com produtividades maiores de bioprodutos de interesse industrial, deve-se também se atentar para metodologias de tratamento de meios de cultivo residuais provenientes desses processos já que, em processos industriais, as quantidades de água e resíduos de sais e matéria orgânica originados dos cultivos podem ser muito grandes e acarretar em impactos negativos no meio ambiente como poluição de solo e corpos hídricos.

Os processos convencionais mais empregados para remoção de matéria orgânica em efluentes consistem em coagulação, floculação, sedimentação e filtração, ou seja, processos físicos e químicos, sendo a coagulação/floculação aqueles mais economicamente viáveis para aplicação em escala industrial (GRANADOS et al., 2012).

Estudos de tratamento para reuso de meio de cultivo de *Arthrospira platensis* já foram avaliados em trabalhos recentes na literatura, envolvendo processos físicos e químicos. Morocho-Jácome et al. (2015a) utilizaram processo físico-químico de floculação e adsorção para tratar meio de cultivo processado de *Arthrospira platensis*, contribuindo para o desenvolvimento de técnicas de tratamento onde foi possível promover a remoção de matéria orgânica e pigmentos, possibilitando o reuso deste meio tratado em novos cultivos. A avaliação da capacidade de coagulação de sais de ferro em combinação com uso de carvão ativado em pó para tratar meio proveniente de cultivo de *Arthrospira platensis* (MEJIA-DA-SILVA et al., 2018) também já foi realizada e demonstrou resultados promissores como metodologia de tratamento de meios residuais desta cianobactéria. Camargo de Jesus (2016) fez o tratamento para reuso de meio residual de *Arthrospira platensis* cujo objetivo era fazer a remoção de matéria orgânica natural e pigmentos através de métodos físicos de microfiltração e ultrafiltração, pois estes processos que fazem uso de membranas de separação favorecem resultados sem muita variação e geram efluentes de boa qualidade. Contudo, apesar da vantagem de processos físicos típicos que não induzem alterações químicas no meio, ainda existem algumas desvantagens, como o aumento dos custos de produção por centrifugação e incrustação da membrana durante a filtração que são alguns dos grandes desafios a serem mais estudados. Com isso, estudos envolvendo outras metodologias de tratamento mais baratas e simplificadas como tratamentos biológicos que usam microrganismos presentes naturalmente no cultivo de microalgas, as quais podem degradar matéria orgânica provenientes das próprias microalgas em questão, ainda são escassos na literatura, bem como o estudo de meios residuais provenientes de cultivo de outros microrganismos fotossintetizantes, o que leva a necessidade de um maior número de estudos que busquem avaliar estes processos já que eles se tornam, a cada dia que passa, mais necessários para se alcançar maior sustentabilidade para a produção de biomassa de microalgas e cianobactérias.

Como pode ser visto, já existem na literatura trabalhos que demonstraram eficácia no tratamento para reuso desses meios de cultivo residuais provenientes de cultivos de microalgas e cianobactérias, porém ainda há necessidade de se explorar mais novos métodos de tratamento tendo em vista se utilizar menos reagentes químicos e processos físicos de elevado custo. O trabalho atual visa propor uma nova metodologia de tratamento de meio de cultivo residual da microalga *Ankistrodesmus braunii*, que tem

como princípio o tratamento biológico, ou seja, o uso de outros microrganismos já naturalmente presentes em co-cultura com essas microalgas, que estimulados para se multiplicarem, poderiam promover a decomposição de matéria orgânica e pigmentos presentes no meio usado, viabilizando o mesmo para reuso em novos cultivos.

2.4. Propriedades dos tratamentos biológicos de efluentes

Os tratamentos biológicos de efluentes consistem, basicamente, na degradação de matéria orgânica dissolvida e suspensa em gases, biomassa microbiana e lodo por um consórcio de microrganismos em um sistema (SEMBLANTE, et al., 2014). À medida que consomem estes resíduos elas se multiplicam e podem permitir que a matéria orgânica eventualmente se desloque da solução de águas residuais, produzindo um lodo que pode ser facilmente removido como um resíduo sólido. De acordo com Samer, (2015), bactérias heterotróficas compõem o principal grupo desses microrganismos, sendo a oxidação biológica e biossíntese as duas formas pelas quais microrganismos decompõem matéria orgânica de um meio. A oxidação biológica originada pela metabolização microbiana forma alguns subprodutos que ficam dissolvidos no meio, já a biossíntese gera a matéria orgânica dissolvida em novas células resultantes de sua multiplicação, formando uma biomassa que pode ser removida posteriormente por sedimentação.

Uma das vantagens do uso de tratamento biológico de efluentes é a facilidade de ser conduzido bem como custo menor de operação quando comparado a outros processos, como aqueles que fazem uso de processos físico-químicos (MACHINENI, 2019).

Dentre os principais tipos de tratamentos biológicos, podem-se destacar os processos aeróbicos, os quais utilizam microrganismos aeróbicos, que metabolizam oxigênio para consumir matéria orgânica. A tecnologia que mais utiliza este processo é o lodo ativado, onde oxigênio é fornecido a microrganismos num tanque de aeração para formar o lodo biológico. O lodo formado é homogeneizado ao efluente, causando biodegradação da matéria orgânica ali presente através da conversão dessa matéria orgânica em nova biomassa microbiana, dióxido de carbono e água (BRANCO, 1964; CHAN et al., 2009).

Processos anaeróbicos são aqueles que utilizam microrganismos anaeróbicos, que não precisam de oxigênio para consumir matéria orgânica, produzindo biomassa, metano e

dióxido de carbono. Através do uso de enzimas específicas, bactérias e arqueias fazem a decomposição da matéria orgânica, na ausência de oxigênio, por processos de hidrólise, acidogênese e metanogênese. Estes processos têm-se apresentado como sendo uma alternativa economicamente viável na qual se converte, biologicamente, a matéria orgânica presente em um determinado efluente em biogás (TAWFIC, et al., 2022).

Já nos processos anóxicos de tratamento biológico, nos quais microrganismos usam compostos nitrogenados, como nitratos e nitritos e fósforo para degradar matéria orgânica, sendo assim, o principal objetivo do tratamento anóxico é remover o nitrogênio e o fósforo do efluente de águas residuais (YORKOR & MOMOH, 2019). Este processo, devido a sua peculiaridade, é utilizado em efluentes específicos onde há acúmulo de nitrogênio e fósforo, sendo o tratamento feito por microrganismos específicos que conseguem metabolizar estes compostos.

Em geral, os sistemas aeróbicos são mais adequados para o tratamento de águas residuais com concentrações biodegradáveis de DQO inferiores a 1000 mg L^{-1} , enquanto os sistemas anaeróbicos são adequados para o tratamento de águas residuais com concentrações biodegradáveis de DQO superiores a 4000 mg L^{-1} (CHAN et al., 2009). Geralmente os tratamentos biológicos constituem a segunda etapa de tratamento de efluentes, sendo iniciado logo após etapas iniciais de filtração para remoção de partículas sólidas do efluente. Essa metodologia é muito utilizada para que o efluente tratado seja reduzido drasticamente o teor de poluentes e assim possa ser descartado dentro de níveis seguros para o ambiente, de acordo com o que preveem as legislações ambientais. Podem também ser utilizados em conjunto com processos físicos e/ou químicos para otimização da remoção dos compostos indesejados, dependendo do tipo de efluente em questão.

Como maneira de monitoramento da eficácia do processo, algumas metodologias de análises são empregadas como as demandas químicas e bioquímicas de oxigênio (BQO/DBO), onde são quantificadas as quantidades de oxigênio necessárias para que os microrganismos possam consumir uma determinada quantidade de matéria orgânica, além de técnicas de medição de absorvância em comprimento de onda específico (254 nm) o qual detecta presença de matéria orgânica em uma amostra em uma maneira precisa e mais simplificada (EDZWALD et al., 1985; WEISHAAR et al., 2003). Além disso, parâmetros como controle de temperatura, pH e teor de nutrientes dissolvidos também podem ser usados em conjunto para um monitoramento mais apurado.

Com base nestes princípios de tratamento biológico padrão, foi possível idealizar uma metodologia de tratamento biológico para meios de cultivo de microrganismos fotossintetizantes, mais especificamente, para tratar meio BOLD 3N residual proveniente de cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, para que o potencial de reuso do mesmo possa ser avaliado, evitando-se assim o gasto excessivo de água com novos cultivos e descarte de sais e matéria orgânica no meio ambiente, tornando todo o processo de produção de biomassa microalgal mais sustentável e ecologicamente correto.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve a finalidade de fazer o estudo do reaproveitamento do meio de cultura residual, proveniente de cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, por tratamento biológico para remoção de matéria orgânica e pigmentos remanescentes, através do estímulo do crescimento da comunidade bacteriana presente naturalmente em co-cultura com esta microalga.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular usando meio de cultivo BOLD 3N novo nas condições adequadas de temperatura, intensidade luminosa e pH para seu desenvolvimento para acompanhamento de crescimento celular.
- Separação da biomassa de *Ankistrodesmus braunii* para obtenção de meio de cultivo residual.
- Tratamento biológico do meio residual em diferentes vazões específicas de aeração e temperaturas.
- Avaliação da remoção de matéria orgânica e pigmentos dos meios residuais tratados pelos processos biológicos.
- Avaliação dos valores de pH, concentrações de nitrato, expressas em nitrato de sódio, e de amônia, expressas em cloreto de amônio, dos meios residuais tratados biologicamente.

- Determinação da concentração celular bacteriana nos meios residuais e tratados.
- Centrifugação de amostras de meios tratados biologicamente.
- Tratamento com carvão ativado em pó (CAP) seguido de centrifugação de amostras de meios tratados biologicamente.
- Ajuste de pH dos meios tratados somente por processo biológico ou com adição de etapa de tratamento com CAP previamente à centrifugação para o valor correspondente ao meio BOLD 3N.
- Ajuste das concentrações de nitrato dos meios tratados para que contenham a mesma concentração de nitrato que o meio novo BOLD 3N.
- Cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotatório usando meios de cultivo tratados nas condições adequadas de temperatura e intensidade luminosa para seu desenvolvimento para acompanhamento de crescimento celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do meio de cultivo residual de *Ankistrodesmus braunii*

Nesta etapa do trabalho, foi obtido o meio de cultivo residual de *Ankistrodesmus braunii*, proveniente de processo semi-contínuo de cultivo desta microalga, de modo que em etapa seguinte (item 4.2) ele sofra diferentes tratamentos, para, a seguir, ser utilizado em novos cultivos desta microalga (item 4.3).

4.1.1. Microrganismo e meio de cultivo.

O microrganismo cultivado para gerar os meios residuais, que posteriormente foram submetidos a processos de tratamento biológico em reator específico, foi *Ankistrodesmus braunii* (UTEX 245), proveniente da Universidade do Texas, cultivado em meio BOLD 3N (BISCHOFF & BOLD, 1963) modificado, por adicionar três vezes mais nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (BRESAOLA et al., 2016). As bactérias presentes nos

meios de cultivo residuais e tratados foram isoladas em Plate Count Agar (PCA, Oxoid Ltd, Inglaterra) para contagem de colônias.

4.1.2. Preparação de inóculo de *Ankistrodesmus braunii*.

Um volume de 1 ml de amostra contendo células de *Ankistrodesmus braunii* em suspensão, previamente mantidas em 200 mL de meio BOLD 3N (BISCHOFF & BOLD, 1963) e contidas em erlenmeyer de 500 mL sob agitação constante de 110 rpm em agitador rotativo, a 25 ± 1 ° C e sob exposição de $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, foram transferidos para erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 200 mL de meio BOLD 3N novo. Ao total, foram feitos inóculos em 16 frascos os quais foram colocados no agitador rotatório e mantidos nas mesmas condições descritas acima durante um período de aproximadamente 30 dias e depois centrifugadas a 1850 rpm por 20 minutos (IEC Model K, DAMON/IEC DIVISION) para que houvesse biomassa suficiente para obter 250 mg L^{-1} de inóculo para iniciar os ensaios nos fotobiorreatores (BRESAOLA et al., 2019).

4.1.3. Condições de cultivo de *Ankistrodesmus braunii* para obtenção de meio residual.

Os cultivos iniciais da microalga *Ankistrodesmus braunii* para a produção de meio de cultivo residual foram realizados por processo semi-contínuo em fotobiorreatores tubulares, sendo eles do tipo air-lift, os quais são constituídos por tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm interligados entre si e frasco coletor de vidro. O volume total do sistema foi de 3,5 L e o volume iluminado correspondeu a 2,0 L, com fluxo da cultura de $40 \pm 1 \text{ L.h}^{-1}$ impulsionados por bomba de ar. A energia luminosa foi fornecida por lâmpadas fluorescentes instaladas no centro do fotobiorreator de modo que todo o fluxo estava exposto. A temperatura de cultivo foi de 25 ± 1 °C e a intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, medida por fot\u00f4metro LICOR LI-250A, e o pH mantido em $7,0 \pm 0,5$ com inje\u00e7\u00e3o de CO_2 , controlada por v\u00e1lvula solen\u00f3ide (BRESAOLA et al., 2019), sendo a concentra\u00e7\u00e3o celular inicial de in\u00f3culo de 250 mg L^{-1} . O tempo total de cultivo neste

sistema foi de 22 dias, onde houve 12 dias de fase de batelada seguida de 5 dias de 1º ciclo e finalmente mais 7 dias de 2º ciclo. A estabilização dos valores de concentração celular máxima alcançadas em cada etapa do processo semi-contínuo definiu seu fim, que correspondeu ao tempo de realização de cada corte do processo semi-contínuo.

4.2. Tratamentos dos meios residuais do cultivo de *Ankistrodesmus braunii*.

Após o crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular, o meio residual obtido após centrifugação a 1850 rpm por 20 minutos (IEC MODEL K, DAMON/IEC DIVISION), foi submetido a diferentes tratamentos para posterior uso em novos cultivos da microalga. Na Figura 2 são apresentados, através de um fluxograma, os tratamentos biológicos realizados no meio residual.

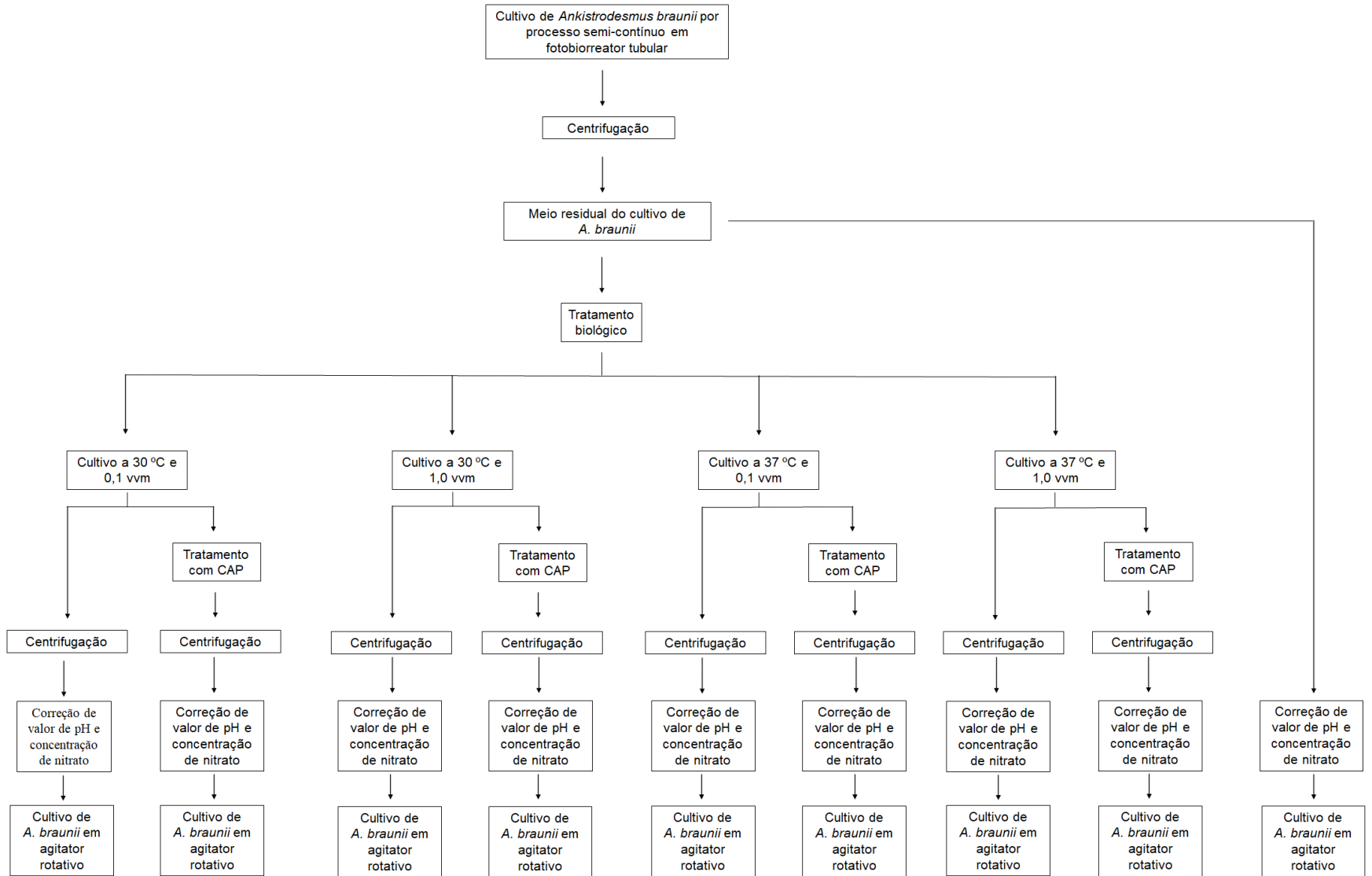


Figura 2: Fluxograma de obtenção de meio de cultivo de *Ankistrodesmus braunii* a partir de seu cultivo semi-contínuo em fotobiorreator tubular e tratamentos para novo cultivo desta microalga em agitador rotativo

4.2.1. Tratamentos biológicos isoladamente

Foram realizados tratamentos biológicos, que ocorreram em tubos de ensaio de vidro de 500 mL de capacidade cada, contendo 300 mL de meio residual, os quais foram imersos em banho-maria com controle de temperatura (UNITEMP, FANEM[®] São Paulo - Brasil), mantida constante durante o período de tratamento. Um difusor de ar conectado a um duto central de ar comprimido filtrado por 3 colunas de carvão ativado e 1 membrana filtrante de porosidade 0,2 μm (Midisart 2000) foi inserido até a base de cada tubo como meio de aerar o ensaio, e as diferentes aerações foram ajustadas com auxílio de rotâmetro e registros metálicos para gases. Tubos de vidro de 10 mm de diâmetro foram acoplados em cada tampa de tubo do experimento com o objetivo de condensar a água arrastada pela aeração durante o processo de tratamento. Todo esse sistema montado constituiu um reator de tratamento biológico como pode ser observado nas Figuras 3 e 4.



Figura 3. Reator de tratamento biológico.

(Fonte: Elaborado pelo autor.)



Figura 4. Amostras no interior do reator.

(Fonte: Elaborado pelo autor.)

Nesta etapa, os tratamentos biológicos realizados com as próprias bactérias presentes no meio de cultivo residual da microalga, consistiram em duas temperaturas (30 °C e 37°C) e duas vazões específicas de aeração (0,1 vvm e 1 vvm), totalizando quatro condições experimentais (Figura 2). Tendo em vista a obtenção de maior quantidade de meio para os experimentos subsequentes e obtenção da variabilidade biológica dos tratamentos, bem como aproveitamento total dos reatores em cada lote de operação, foram realizados 4 cultivos em vazão de aeração de 1vvm e 4 cultivos com vazão de aeração de 0,1 vvm. Uma parte destes meios provenientes destes tratamentos biológicos foi centrifugada a 1850 rpm por 20 minutos (IEC MODEL K, DAMON/IEC DIVISION) e os sobrenadantes provenientes de cada tratamento biológico tiveram os valores de pH e as concentrações de nitrato de sódio corrigidos (item 4.2.3) para os valores correspondentes ao meio BOLD 3N novo. Esses meios foram usados em cultivos de *Ankistrodesmus. braunii* em agitadores rotativos (item 4.3). A outra parte do meio residual foi tratada com carvão ativo em pó, como discriminado no item 4.2.2.

4.2.2. Pós-tratamento com carvão ativado em pó (CAP) do meio que sofreu tratamento biológico.

4.2.2.1. Ensaio preliminar para a escolha da concentração de carvão ativado em pó (CAP) a ser utilizada no tratamento dos meios tratados biologicamente para remoção adicional de matéria orgânica e pigmentos.

Para verificar a remoção de material orgânico e de pigmentos do meio tratado biologicamente, foram realizados testes em tubos de ensaio de 15 mL e capacidade, contendo 10 mL de meio tratado a 30 °C e 1,0 vvm, com concentrações de CAP que foram cada uma de 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹ e 200 mg L⁻¹. As amostras foram homogeneizadas em misturador de balanço (K45-1510, KASVI) por 60 minutos e depois lidas as absorbâncias a 254 e 440 nm (**Abs₂₅₄** e **Abs₄₄₀**) para verificar remoção de matéria orgânica e pigmentos (item 4.4.3).

4.2.2.2. Tratamento com CAP realizado nos meios residuais tratados biologicamente para uso em novo cultivo de *Ankistrodesmus braunii*.

A etapa de pós-tratamento com carvão ativado em pó (CAP) foi feita com concentração deste de 50 mg L^{-1} , que foi a condição escolhida decorrente dos experimentos realizados em 4.2.2.1. A mistura foi deixada em homogeneização em um floclador (SW6, Armfield) por 60 minutos a 250 rpm, como apresentado na Figura 5. Após esse período, os meios foram centrifugados nas mesmas condições que os meios tratados somente por tratamento biológico e os sobrenadantes provenientes de cada tratamento tiveram os valores de pH e as concentrações de nitrato de sódio corrigidos (item 4.2.3) para os valores correspondentes ao meio BOLD 3N novo. Esses meios que sofreram tratamento biológico com subsequente tratamento com CAP também, após a devida correção dos valores de pH e concentrações de nitrato, foram usados em cultivos de *Ankistrodesmus braunii* em agitadores rotativos (item 4.3).



Figura 5. Pós-tratamento com uso de CAP dos meios previamente tratados por processo biológico.

(Fonte: Elaborado pelo autor.)

4.2.3. Correção dos valores de pH e das concentrações de nitrato de sódio dos meios submetidos a tratamento biológico com tratamento posterior com carvão ativado em pó (CAP) para cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotativo.

Os ajustes dos valores de pH foram feitos através de injeção de CO₂ com difusor de ar diretamente nas amostras, monitorando-se o valor de pH para fixação do mesmo no valor desejado de $7,0 \pm 0,5$ com o auxílio de potenciômetro (METTLER TOLEDO M300). A partir das determinações das concentrações de nitrato de sódio residuais nos meios de cultivo tratados, foram realizadas as correções das concentrações desses meios para o valor equivalente ao meio BOLD 3N novo, de modo que esses meios com as devidas correções desses parâmetros pudessem ser utilizados na terceira etapa do trabalho, que foi o cultivo de *Ankistrodesmus braunii* nos meios tratados (item 4.3).

4.3. Cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotativo utilizando meios de cultivo submetidos a tratamento biológico e pós-tratamento.

Os cultivos finais da microalga *Ankistrodesmus braunii* para verificação de crescimento da mesma em meios de cultivo submetidos às diferentes condições de tratamento biológico e pós-tratamento (Figura 2) foram realizados em agitador rotativo, utilizando-se 100 mL de amostras de meios de cultivo residuais tratados, com as devidas correções de nitrogênio e valor de pH (item 4.2.3) em erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Foram realizados cultivos padrão utilizando meio BOLD 3N novo e BOLD 3N novo adicionado de cloreto de amônio para o meio ter concentração de nitrogênio amoniacal igual à média daqueles que sofreram os diferentes tratamentos biológicos. Também foi realizado um cultivo onde o meio proveniente do cultivo de *A. braunii* em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo não passou por nenhum tratamento, somente adicionado de fonte de nitrato de sódio para correção de sua concentração (Figura 2). A concentração do inóculo foi de 250 mg L^{-1} . A intensidade luminosa da seção do agitador rotativo usada para o cultivo foi ajustada para $60 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura do ambiente mantida em $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$. O pH dos meios de cultivo que necessitaram correção foram ajustados para $7,0 \pm 0,5$ com injeção de CO₂. O tempo de cultivo foi de 7 dias, em que se observou obtenção de concentração celular máxima estabilizada.

4.4. Técnicas Analíticas

4.4.1 Determinação da concentração celular de *Ankistrodesmus braunii*.

As concentrações celulares de *Ankistrodesmus braunii* foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLUS) a 550 nm (BRESAOLA et al, 2019). Os valores obtidos de absorvância foram expressos em massa seca de biomassa por volume de suspensão celular utilizando curva de calibração que foi obtida através do uso inicial de 25 mL de uma suspensão concentrada de células em fase de crescimento exponencial, as quais posteriormente foram filtradas e lavadas com água destilada em uma membrana de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade previamente seca a 70 °C por 12 horas e pesada.

As amostras foram levadas à estufa a 100 °C até obtenção de massa constante. Pela diferença entre a massa da membrana com as células secas e a massa da membrana sem as células, foi possível obter a massa de células contida no volume filtrado de suspensão celular. A partir desta mesma suspensão, por meio da absorvância de 550 nm para *Ankistrodesmus braunii* e suas diferentes diluições, foi possível obter uma curva que relaciona a concentração celular, expressa em massa seca por litro de suspensão, com a absorvância da amostra como pode ser vista na Figura 6.

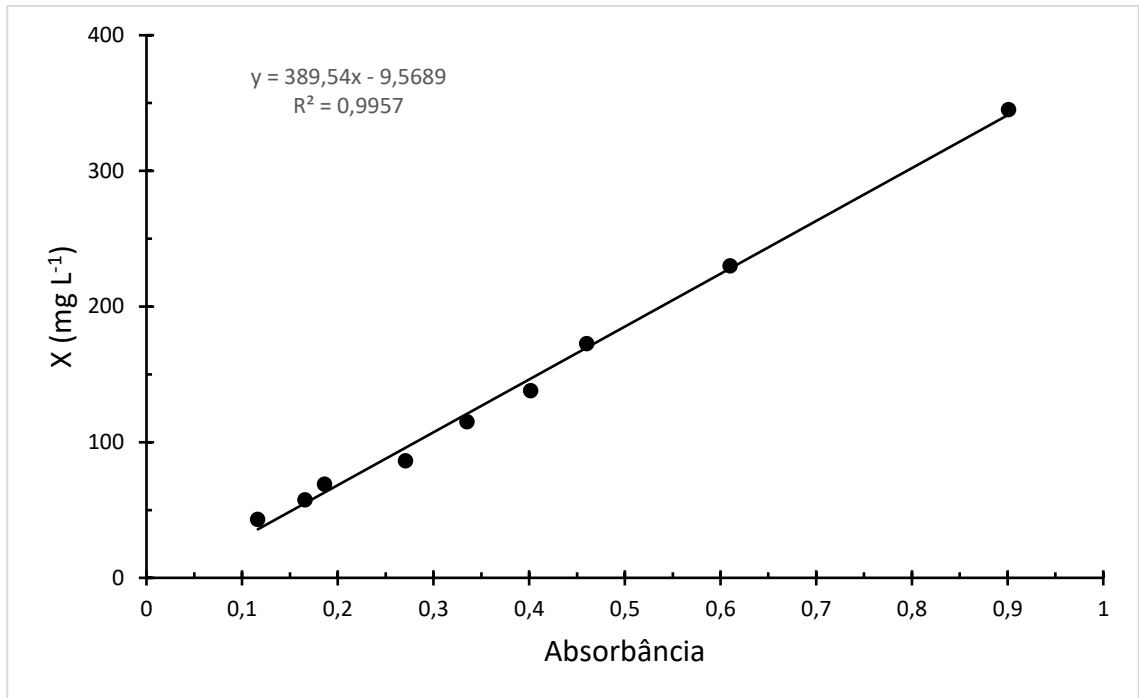


Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Ankistrodesmus braunii*.

4.4.2. Determinação da concentração celular das bactérias provenientes dos meios de cultivo residuais e tratados.

O volume de 1 mL de amostra foi transferido para frasco contendo 100 mL de cloreto de sódio 0,9 % (m/v) e procedeu-se à agitação por 15 minutos com auxílio de pérolas de vidro e barra magnética. Em seguida, realizou-se a diluição seriada e, para cada diluição de interesse, um volume de 1 mL foi transferido para placa de Petri, sendo adicionada cerca de 20 mL de meio de cultura Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas e as colônias que cresceram foram quantificadas.

4.4.3. Determinação do teor de matéria orgânica e pigmentos.

A determinação dos teores de matéria orgânica e pigmentos presentes nas amostras, para que pudesse ser observado o decaimento dos respectivos valores antes, durante e após o tratamento biológico, para validação do mesmo, foram realizados medindo-se a absorbância das amostras em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLUS) em comprimentos de onda de 254 nm

(A_{bs254}) para matéria orgânica (KABSCH-KORBUTOWICZ, 2005) e 440 nm (A_{bs440}) para pigmentos (FERRARI; TASSAN, 1999) tanto no meio filtrado como no meio não filtrado, denominado meio bruto. No caso das leituras em meios filtrados, as amostras foram filtradas em membrana de filtração de acetato de celulose de porosidade 0,45 μm com auxílio de sistema de filtração a vácuo. Os valores de absorvância nas amostras brutas tiveram a inclusão do índice “b” em sua notações (A_{bs254b} , A_{bs440b}), enquanto que as amostras filtradas tiveram a inclusão do índice “f” em sua notações (A_{bs254f} , A_{bs440f}).

4.4.4. Acompanhamentos dos valores de pH.

Todos os valores do pH foram medidos com o uso potenciômetro (METTLER TOLEDO M300) através da imersão do eletrodo previamente calibrado nos cultivos em fotobiorreator tubular e amostras de meios residuais e tratados.

4.4.5. Determinação do teor de nitrato.

A técnica ultravioleta, de acordo com APHA (1998), foi utilizada como forma de determinar a concentração de nitrato das amostras lendo suas absorvâncias a 220 nm, sendo as mesmas previamente filtradas duas vezes, sendo a primeira filtração em filtro de acetato de celulose de 0,45 μm seguido de filtração em fibra de vidro de porosidade de 0,45 μm , ambos para remoção de matéria orgânica em suspensão e evitar oxidação do nitrato, fato que poderia interferir no resultado final. Já como meio de eliminar a interferência da matéria orgânica dissolvida que não foi eliminada pelo processo de filtração, se fez necessária a leitura de absorvância das amostras também em 275 nm para corrigir o valor da concentração de nitrato, já que a matéria orgânica dissolvida também pode absorver comprimento de onda de 220 nm. O cálculo consistiu em subtrair duas vezes o valor da absorvância de 275 nm do valor da absorvância de 220 nm, fato que permitiu se obter o valor real do nitrato. Sendo assim, o cálculo pode ser representado por: $Abs\ 220 - 2Abs275$. Foi construída uma curva de calibração para relacionar a absorvância e a concentração de nitrogênio a partir de soluções padrão de nitrato de sódio (Figura 7), a qual foi utilizada para quantificar as concentrações de nitrato nos meios de cultivo, expressas na forma de nitrato de sódio.

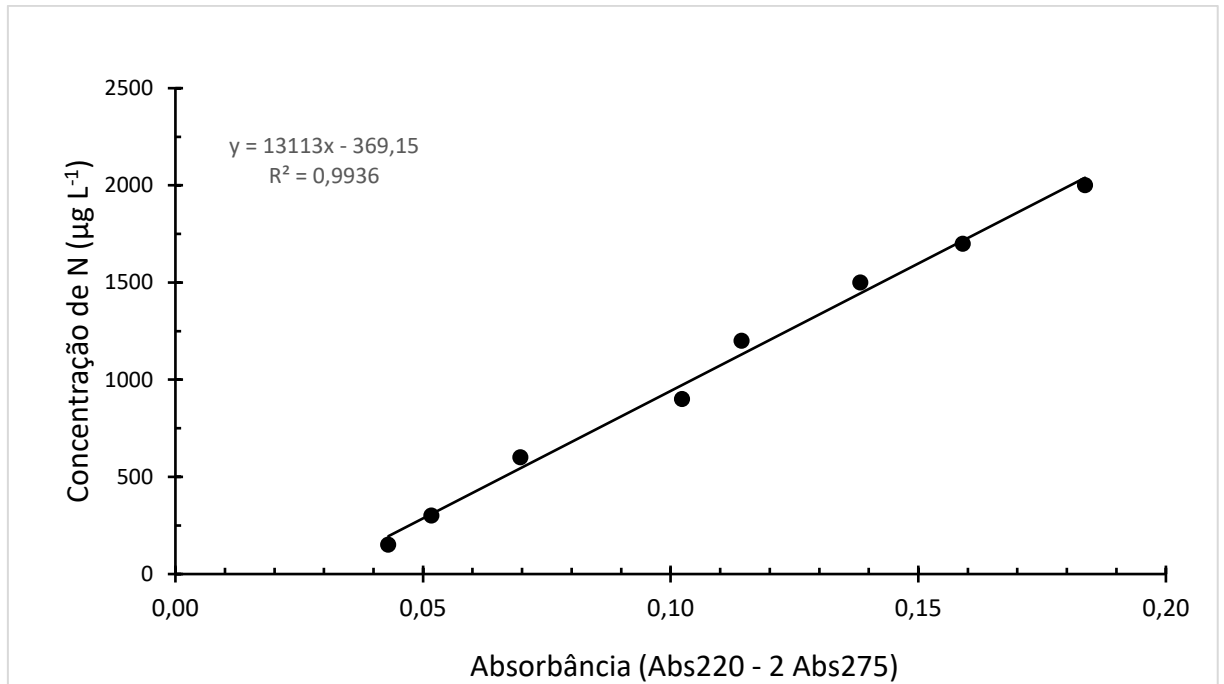


Figura 7. Curva de calibração para determinação da concentração de nitrogênio a partir de soluções padrão de nitrato de sódio.

4.4.6. Determinação do teor de amônia.

A dosagem do teor de amônia nas amostras analisadas consistiu na reação do nitrogênio amoniacal com cloro, dando origem à monocloramina, a qual posteriormente reage com o fenol resultando em indofenol, conferindo cor azulada à amostra, lida a absorbância em espectrofotômetro a 630 nm (KOROLEFF, 1983). Um volume de 10 mL de amostra filtrada previamente em filtro de fibra de vidro de porosidade 0,45 µm foi misturada a 1 mL de solução de citrato trissódico, 1 mL de solução fenólica e 1 mL de solução de hipoclorito de sódio com hidróxido de sódio. As amostras foram deixadas reagindo quimicamente em ambiente escuro por 3 horas e lidas em seguida a absorbância em 630 nm. A partir de soluções padrão de cloreto de amônio, foi construída uma curva de calibração relacionando o valor de absorbância e a concentração de nitrogênio, conforme Figura 8, a qual foi utilizada para quantificar as concentrações de nitrogênio amoniacal nos meios de cultivo, expressas na forma de cloreto de amônio.

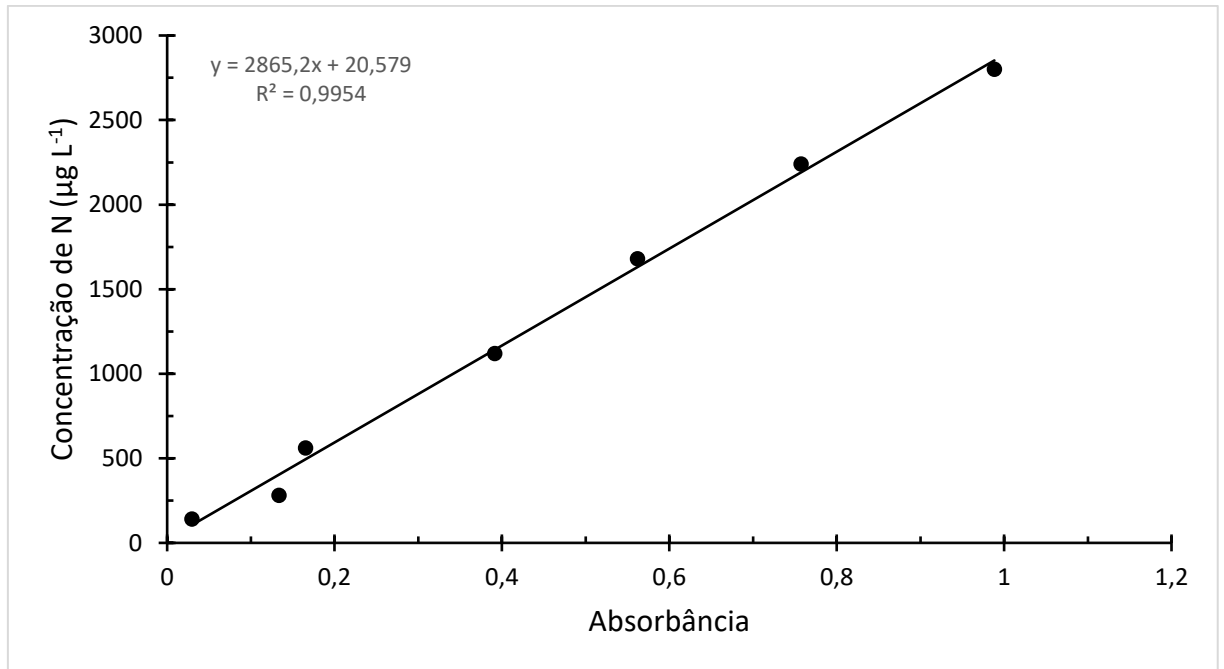


Figura 8. Curva de calibração para determinação da concentração de nitrogênio a partir de soluções padrão de cloreto de amônio.

4.4.7. Determinação da produtividade em células de *Ankistrodesmus braunii*.

A seguinte equação foi empregada para se determinar a produtividade em células:

$$P_x = (X_f - X_i) / \Delta t$$

Onde: P_x = produtividade em células ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)

X_f = concentração celular média final (mg L^{-1})

X_i = concentração celular média inicial (mg L^{-1})

Δt = variação de tempo para atingir X_f (dias)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo para produção de meio residual.

Na Figura 9 estão representados os resultados das curvas de crescimento celular do cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular por processo semi-contínuo, que teve um total de 22 dias com valor de concentração celular máxima média atingida de $2358 \pm 17 \text{ mg L}^{-1}$. O processo de batelada ocorreu do instante zero a 11 dias, enquanto que os 1º e 2º ciclos do processo semi-contínuo ocorreram nos períodos de 12 a 15 dias e 16 a 22 dias, respectivamente.

No começo do processo de cultivo da microalga, caracterizado como um processo descontínuo, houve, como esperado, presença de fase “lag” (BRESAOLA et al, 2019), em que o microrganismo a ser cultivado está em fase de adaptação ao sistema, de modo que não há crescimento celular acentuado observado de imediato após o início do cultivo. Como pode ser visto na curva de crescimento inicial, essa fase durou em média 2 dias, até haver um aumento do crescimento celular a partir do terceiro dia. Com a estabilização do valor de concentração celular máxima obtida, que ocorreu com 11 dias de cultivo (Figura 9), realizou-se o primeiro corte no 12º dia, o qual consistiu em se remover um volume de meio residual com células até que a concentração celular do reator voltasse à concentração celular inicial estipulada de 250 mg L^{-1} com adição de um volume adequado de meio de cultivo novo. As células restantes ali presentes e já adaptadas ao meio de cultivo e ao fotobiorreator, multiplicaram-se de maneira mais rápida eliminando, assim, o tempo de fase “lag”, fato que otimizou a produtividade em células. De fato, as produtividades de cada etapa do processo, sendo elas a batelada (tempo 0 a 11 dias), 1º ciclo (tempo 12 a 15 dias) e 2º ciclo (tempo 16 a 22 dias) foram, respectivamente, $177,6 \pm 4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $517,3 \pm 2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $355,6 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Esses valores de produtividade demonstram a vantagem do processo semi-contínuo para cultivo desta microalga, como já avaliado por Bresaola et al. (2019), já que é possível eliminar a fase “lag” após fase inicial de batelada. É desprezível também o tempo do processo de descarga de meio residual e recarga de meio novo no fotobiorreator em comparação ao tempo de processo com o um todo, evitando-se, assim, o “tempo morto” que ocorre em processos descontínuos de cultivo.

Sendo assim, estes experimentos foram os escolhidos como modelo padrão para o cultivo de *Ankistrodesmus braunii* e úteis para a produção de volume de meios de cultivos residuais

em volume necessário para que fossem feitos os processos de tratamento biológico proposto por este trabalho.

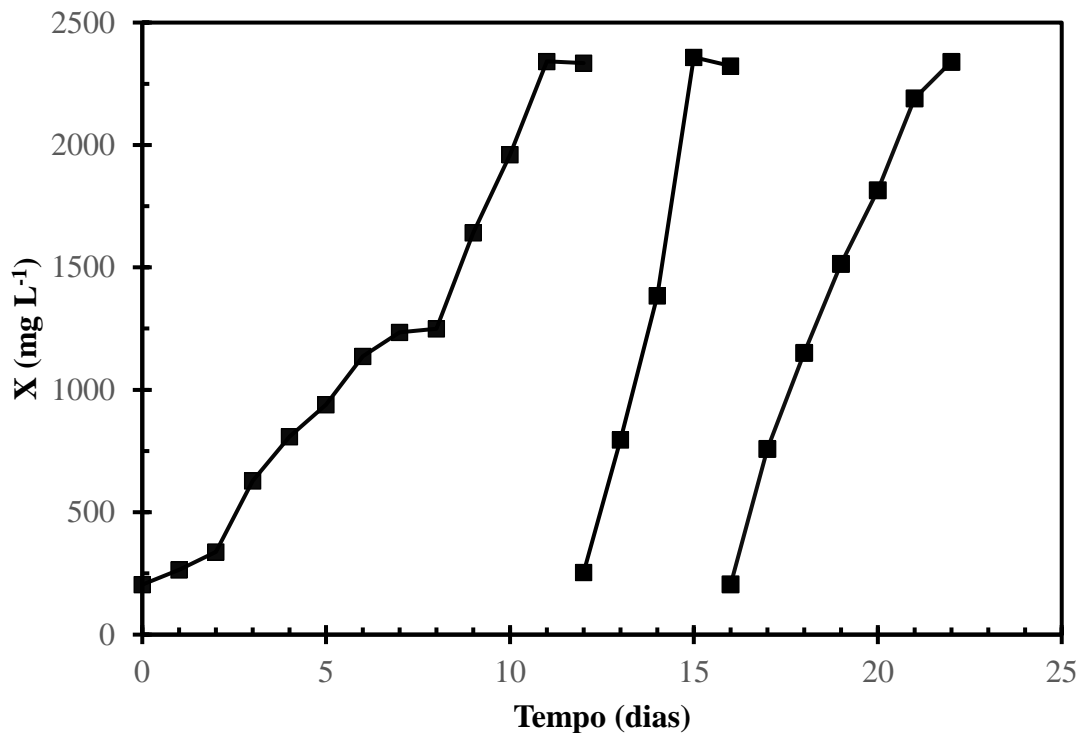


Figura 9 - Concentração celular (X) de *Ankistrodesmus braunii* em função do tempo (dias) do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando meio BOLD 3N em fotobiorreator tubular.

Após o término destes cultivos iniciais de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator tubular por processo semi-contínuo, foi feita uma mistura de todos os volumes de meios residuais com células produzidos de cada lote de produção, ou seja, um volume final de meio residual com células correspondeu à mistura dos volumes de meio produzido na etapa descontínua com o volume da etapa do 1º ciclo e 2º ciclo totalizando, aproximadamente, 20 L de meio. Após isso, uma centrifugação de todo o meio residual com células foi feito para que houvesse a obtenção do meio de cultivo residual com ausência de células de microalgas e, assim, pudessem ser submetidos às análises subsequentes para se avaliar metodologias de tratamentos biológicos dos mesmos para viabilizá-los para reuso. Este meio residual bruto, ou seja, não filtrado, apresentou valores de **Abs_{254b}** e **Abs_{440b}** de 1,303 e 0,521, respectivamente, enquanto que o meio residual filtrado em membrana de 0,45 µm apresentou valores de **Abs_{254f}** e **Abs_{440f}** de 1,054 e 0,149, respectivamente. Como esperado, os valores de absorvância obtidos

nos meios filtrados são menores, pois, nesta operação, parte da matéria orgânica e também parte dos pigmentos ficam retidos na membrana e/ou adsorvidos no material retido na membrana.

5.2. Tratamento biológico

Os experimentos que buscaram avaliar a eficácia de um tratamento biológico realizados a seguir tiveram como base o princípio primordial de um sistema de tratamento biológico de efluentes, o qual se baseia no consumo de matéria orgânica de um sistema por microrganismos ali presentes (VILLEN, 2001). No caso das amostras de meio de cultivo BOLD 3N residuais que se tinha, a idéia era estimular a metabolização do excesso de matéria orgânica pelas próprias bactérias que cresceram em co-cultura com a microalga e que estavam presentes no meio de cultivo. Com isso, não haveria necessidade de se adicionar um outro microrganismo ali, pois era esperado que a bactéria nativamente presente em co-cultura com a microalga já estava metabolicamente adaptada ao meio. De fato, na natureza há uma interação entre microalgas e bactérias, inclusive com produção de moléculas de sinalização (NATRAH et. al., 2014), ambas, microalgas e cianobactérias aproveitam do crescimento em co-cultura para a obter metabólitos importantes para seus crescimentos (SANTO et al., 2022).

Para que houvesse essa metabolização de matéria orgânica desejada por bactérias como metodologia de tratamento biológico do meio residual, partiu-se do pressuposto de que estímulos que favoreceriam esse crescimento bacteriano deveriam ser aplicados em um sistema contendo esses meios residuais, sendo que os parâmetros temperatura e aeração foram escolhidos pela conhecida influência que apresentam em crescimento de bactérias aeróbicas (PIRT, 1975), de modo que a escolha adequada destes parâmetros favoreceria o crescimento bacteriano, contribuindo, conseqüentemente, com a remoção de matéria orgânica e pigmentos presentes no meio residual do cultivo de *Ankistrodesmus braunii* no fotobiorreator tubular.

Para se determinar se seria possível estabelecer uma metodologia desta forma com os meios de cultivo residuais de microalgas, foram realizados 2 ensaios preliminares que visaram exatamente se constatar essa possibilidade.

5.2.1. Determinação do tempo de tratamento biológico.

O primeiro ensaio teve como objetivo se avaliar e definir um tempo de tratamento biológico em um lote de amostras de meio BOLD 3N residual. Uma triplicata (P1a, P1b e P1c) foi feita e cada repetição consistiu no uso de 300 mL de meio de cultivo residual em tubo de vidro de 500 mL inserido no reator de tratamento biológico montado previamente (Figura 3), sendo que as condições de tratamento estipuladas para este experimento foi de submeter as amostras a uma temperatura de 37 °C e 1,0 vvm de aeração.

Foram realizadas leituras de absorbância das amostras submetidas ao tratamento biológico ao longo do tempo para avaliar o decaimento desses valores e determinar o tempo de tratamento biológico ideal dos meios de cultivo provenientes do cultivo de *Ankistrodesmus braunii*. A absorbância medida a 254 nm representa a matéria orgânica (**Abs₂₅₄**) e a absorbância medida a 440 nm representa os pigmentos (**Abs₄₄₀**) e, com isso, visando determinar a influência de se filtrar ou não a amostra no que diz respeito ao resultado final, as medidas de absorbância foram realizadas nas amostras brutas (**Abs_{254b}**, **Abs_{440b}**) e nas amostras filtradas (**Abs_{440f}** e **Abs_{440f}**). Foi possível constatar que amostras filtradas tiveram todos os valores de absorbância menores quando comparados a amostras brutas, já que microrganismos e partículas aglutinadas em suspensão são removidas pelo uso da membrana filtrante, evidenciando, assim, sua função como uma possibilidade de etapa adicional de tratamento, como demonstrado anteriormente com o emprego de filtração tangencial (CAMARGO DE JESUS, 2016).

O acompanhamento das leituras de absorbância em espectrofotômetro foi feito a cada 24 horas transcorridas desde o início do ensaio, no instante 0, até o instante onde houve a confirmação de estabilização destes valores, que foi em 96 horas, de modo que a estabilização dos valores de absorbância ocorreram com 72 horas de cultivo (Tabela 1). Com isso, o tempo de 72 horas foi definido como um período ideal de tratamento das amostras por este processo biológico, sendo, portanto, o tempo escolhido para o acompanhamento nos ensaios seguintes.

Tabela 1. Valores de absorvância nas amostras brutas (**Abs_{254b}** e **Abs_{440b}**) e filtradas (**Abs_{254f}** e **Abs_{440f}**) de meio de cultivo proveniente de cultivo *Ankistrodesmus braunii* tratado biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm.

Tempo (h)	Ensaio P1a (nm)	Ensaio P1b (nm)	Ensaio P1c (nm)
0	Abs_{254b} : 1,303 ± 0,00	Abs_{254b} : 1,303 ± 0,00	Abs_{254b} : 1,303 ± 0,00
	Abs_{440b} : 0,521 ± 0,00	Abs_{440b} : 0,521 ± 0,00	Abs_{440b} : 0,521 ± 0,00
	Abs_{254f} : 1,054 ± 0,00	Abs_{254f} : 1,054 ± 0,00	Abs_{254f} : 1,054 ± 0,00
	Abs_{440f} : 0,149 ± 0,00	Abs_{440f} : 0,149 ± 0,00	Abs_{440f} : 0,149 ± 0,00
	Abs_{254b} : 1,048 ± 0,52	Abs_{254b} : 1,055 ± 0,45	Abs_{254b} : 1,060 ± 0,32
	Abs_{440b} : 0,230 ± 0,29	Abs_{440b} : 0,242 ± 0,09	Abs_{440b} : 0,251 ± 0,09
24	Abs_{254f} : 0,379 ± 0,015	Abs_{254f} : 0,415 ± 0,012	Abs_{254f} : 0,380 ± 0,010
	Abs_{440f} : 0,029 ± 0,009	Abs_{440f} : 0,032 ± 0,002	Abs_{440f} : 0,038 ± 0,016
	Abs_{254b} : 0,470 ± 0,88	Abs_{254b} : 0,479 ± 0,73	Abs_{254b} : 0,450 ± 0,06
	Abs_{440b} : 0,088 ± 0,91	Abs_{440b} : 0,100 ± 0,61	Abs_{440b} : 0,109 ± 0,19
	Abs_{254f} : 0,362 ± 0,010	Abs_{254f} : 0,351 ± 0,015	Abs_{254f} : 0,349 ± 0,012
	Abs_{440f} : 0,018 ± 0,005	Abs_{440f} : 0,020 ± 0,003	Abs_{440f} : 0,022 ± 0,013
48	Abs_{254b} : 0,418 ± 0,05	Abs_{254b} : 0,410 ± 0,29	Abs_{254b} : 0,389 ± 0,25
	Abs_{440b} : 0,070 ± 0,13	Abs_{440b} : 0,088 ± 0,18	Abs_{440b} : 0,078 ± 0,39
	Abs_{254f} : 0,201 ± 0,015	Abs_{254f} : 0,198 ± 0,018	Abs_{254f} : 0,222 ± 0,009
	Abs_{440f} : 0,010 ± 0,001	Abs_{440f} : 0,012 ± 0,004	Abs_{440f} : 0,012 ± 0,016
	Abs_{254b} : 0,425 ± 0,04	Abs_{254b} : 0,417 ± 0,60	Abs_{254b} : 0,408 ± 0,12
	Abs_{440b} : 0,071 ± 0,02	Abs_{440b} : 0,085 ± 0,12	Abs_{440b} : 0,083 ± 0,06
72	Abs_{254f} : 0,208 ± 0,009	Abs_{254f} : 0,206 ± 0,007	Abs_{254f} : 0,200 ± 0,012
	Abs_{440f} : 0,008 ± 0,002	Abs_{440f} : 0,015 ± 0,005	Abs_{440f} : 0,009 ± 0,018

5.2.2. Determinação de concentração celular bacteriana e pH nos diferentes intervalos de tempo de tratamento biológico.

Com a finalidade de se constatar a presença de microrganismos nos meios residuais expostos ao processo de tratamento biológico proposto, bem como saber se a mudança de aspecto físico apresentados pelos mesmos, como turvação e redução da coloração (Figuras 10 e 11) em diferentes tempos de tratamento eram em virtude da presença de bactérias no meio, foram realizadas técnica de isolamento (SANTO, 2020) e contagem celular, de amostras expostas às mesmas condições de tratamento do ensaio preliminar anterior.

Foram realizados ensaios em triplicata (P2a, P2b e P2c), os quais foram submetidos à temperatura de 37 °C e 1,0 vvm. O intervalo de tempo do processo, como estipulado pelo experimento preliminar anterior, foi de 0 até 72 horas e os resultados, expressos em UFC mL⁻¹ podem ser visualizados na Tabela 2. Os valores de pH das amostras tratadas também foram lidos em potenciômetro como forma de verificar se houve alteração de valor em virtude dos tratamentos aplicados.

Com base nos resultados, pode-se observar que houve um aumento do ciclo logarítmico de 10⁷, do tempo 0 (sem tratamento) para 10⁸ com 24 horas de tratamento. Este fenômeno pode ser observado também através da turvação do meio (Figuras 10 e 11), que normalmente ocorre quando do crescimento bacteriano em meio de cultivo, sendo a turbidez um dos métodos de avaliação deste tipo de crescimento (BIER, 1984). Com 48 horas de tratamento, houve decaimento de 1 ciclo logarítmico da concentração celular bacteriana, ou seja, de 10⁸ novamente para 10⁷, mantendo-se esse ciclo logarítmico até as 72 horas finais do tratamento. Esse fenômeno de decaimento da concentração celular pode ter ocorrido pelo aumento dos valores de pH dos meios, possivelmente pela produção de amônia resultante do metabolismo de consumo de matéria orgânica nitrogenada pelas bactérias. Outro fator para o decaimento da concentração celular é o fato que a diminuição da concentração de nutrientes, particularmente de matéria orgânica para suprir a manutenção das células, pode levar estas a um processo de degradação da própria biomassa (BEEFTINK et al., 1990).

Contudo, mesmo havendo essa diminuição de ciclo logarítmico que se manteve praticamente constante de 48 até 72 horas de tratamento, a população bacteriana remanescente foi útil para que promovesse continuidade na remoção de **Abs₂₅₄** e **Abs₄₄₀** até 72 horas, como foi verificado na Tabela 1, anteriormente.

Tabela 2. Determinação da concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹) e pH ao longo do tempo de meio de cultivo proveniente de cultivo *Ankistrodesmus braunii* tratado biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm.

Tempo (h)	Ensaio P2a	Ensaio P2b	Ensaio P2c
0	UFC mL ⁻¹ : 5,20 x 10 ⁷ ± 0,00	UFC mL ⁻¹ : 5,20 x 10 ⁷ ± 0,00	UFC mL ⁻¹ : 5,20 x 10 ⁷ ± 0,00
	pH: 7,5 ± 0,0	pH: 7,5 ± 0,0	pH: 7,5 ± 0,0
24	UFC mL ⁻¹ : 2,10 x 10 ⁸ ± 3,22 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 1,71 x 10 ⁸ ± 5,29 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 1,13 x 10 ⁸ ± 8,18 x 10 ⁵
	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0
48	UFC mL ⁻¹ : 1,59 x 10 ⁷ ± 3,46 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 1,45 x 10 ⁷ ± 9,60 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 2,28 x 10 ⁷ ± 6,60 x 10 ⁵
	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0
72	UFC mL ⁻¹ : 1,48 x 10 ⁷ ± 4,53 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 1,56 x 10 ⁷ ± 7,82 x 10 ⁵	UFC mL ⁻¹ : 1,50 x 10 ⁷ ± 6,19 x 10 ⁵
	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0	pH: 9,0 ± 0,0



Figura 10. Meio residual.

(Fonte: Elaborado pelo autor).



Figura 11. Meio com 24 horas de tratamento biológico.

(Fonte: Elaborado pelo autor).

5.2.3. Planejamento experimental dos ensaios principais.

O planejamento experimental utilizado neste trabalho, que teve como metodologia inovadora o tratamento biológico do meio de cultivo proveniente de cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, foi o planejamento por blocos (NETER & WASSERMAN 1974), conforme detalhado na Tabela 3. Nesta etapa do trabalho, foram avaliadas duas vazões específicas de aeração sendo elas de 0,1 vvm e 1,0 vvm e também duas temperaturas, de 30 °C e 37 °C. O intuito de usar níveis de aeração e temperatura menores teve como objetivo avaliar o comportamento dos microrganismos em condições mais brandas de tratamento biológico, o que acarretaria em menor custo de operação industrial, desde que não houvesse tempo adicional de tratamento dos meios de cultivo. O tempo estipulado de tratamento em cada condição experimental, com base também nos ensaios preliminares, foi de 72 horas. Todos os ensaios de tratamento biológico realizados foram feitos em quadruplicata no reator.

Tabela 3: Planejamento experimental dos ensaios principais, realizados em quadruplicata, correspondentes aos diferentes tratamentos biológicos a que os meios residuais de crescimento de *Ankistrodesmus braunii* foram submetidos para remoção de matéria orgânica e pigmentos.

Experimento	Temperatura (°C)	Aeração* (vvm)
1a	30	1,0
1b	30	1,0
1c	30	1,0
1d	30	1,0
2a	30	0,1
2b	30	0,1
2c	30	0,1
2d	30	0,1
3a	37	1,0
3b	37	1,0
3c	37	1,0
3d	37	1,0
4a	37	0,1
4b	37	0,1
4c	37	0,1
4d	37	0,1

*Vazão específica de aeração (volume de ar por volume de meio por minuto)

5.2.3.1. Remoção de matéria orgânica e pigmentos.

Alguns trabalhos na literatura já constataram a ação inibitória provocada pelo excesso de matéria orgânica em cultivos de microrganismos fotossintetizantes, ação esta que pode causar vazamento de citomembrana, estresse oxidativo, inibição de fotossíntese e inibição de divisão celular (LU et al., 2020). Os polissacarídeos fazem parte da maior composição dessa matéria orgânica residual, aumentando a viscosidade do meio, fato que diminui o rendimento do fotossistema II (DEPRAETERE et al. 2015). A metabolização destes mesmos componentes por bactérias que vivem juntas com microrganismos fotossintetizantes também já foi constatada, como observado por Arora et al. (2012), no qual foi avaliado o potencial de degradação de polissacarídeos originários da parede celular da microalga *Tetraselmis indica* por bactérias através da enzima carboidrase. Tendo conhecimento destes fatos, pode-se supor que os fenômenos observados com base nos experimentos realizados tiveram a mesma tendência.

O meio residual proveniente do cultivo de *A. braunii* em fotobiorreator tubular (item 5.1), foi como especificado na Tabela 3, submetido a diferentes tratamentos biológicos. Antes desses tratamentos, o meio foi caracterizado quanto a matéria orgânica e pigmentos. Como comentado no item 5.1, o meio residual bruto, ou seja, não filtrado, apresentou valores de **Abs_{254b}** e **Abs_{440b}** de 1,303 e 0,521, respectivamente, enquanto que o meio residual filtrado em membrana de 0,45 µm apresentou valores de **Abs_{254f}** e **Abs_{440f}** de 1,054 e 0,149, respectivamente.

Com base nas leituras dos valores de absorvância (**Abs_{254b}**, **Abs_{254f}**, **Abs_{440b}** e **Abs_{440f}**) de todas as amostras submetidas a tratamento biológico nas diferentes aerações (0,1 vvm e 1,0 vvm) e temperaturas (30 °C e 37 °C) durante o tempo 0 até as 72 horas finais, foi possível constatar que houve, em todos os ensaios, e diminuição gradual dos valores de ambas absorvâncias, confirmando uma remoção de matéria orgânica e pigmentos dos meios residuais, fato que valida a técnica de tratamento biológico proposto por este trabalho.

Na Tabela 4 temos os valores de todas as absorvâncias dos meios constituídos das misturas dos meios tratados biologicamente pelo período de 72 horas, ou seja, os meios finais provenientes da quadruplicata dos tratamentos biológicos, conforme especificado na Tabela 3. Como forma de simplificar a visualização e análise dos resultados de cada tratamento biológico e ter volume suficiente para prosseguir com os ensaios posteriores (pós-tratamento, item 5.2.4), com visualização mais clara dos resultados, houve a necessidade de se juntar os meios residuais dos tratamentos biológicos dentro de seu próprio grupo. Vale ressaltar que análises de cada

amostra individual foi feita antes de se formar as misturas (*blends*), e os resultados de todos os parâmetros avaliados das amostras individuais foram equivalentes aos resultados das respectivas misturas. As amostras submetidas a condições de tratamento de 1,0 vvm de aeração de 37 °C de temperatura foram as que apresentaram redução dos valores de absorvância mais acentuados, com queda 67,8 % e 87,5 % nos valores de **Abs254b** e **Abs440b**, respectivamente. Já os ensaios submetidos a aeração de 0,1 vvm e temperatura de 30 °C resultaram nas menores reduções de absorvância, embora, mesmo assim, proporcionaram uma queda importante, correspondentes, nas amostras brutas, de 55,6 % e 66,4 %, respectivamente. Nas amostras filtradas, para o ensaio a 37 °C e 1 vvm, as quedas nos valores de **Abs254f** e **Abs440f**, foram de 80,7% e 92,6%, respectivamente, enquanto no ensaio a 30 °C e 0,1 vvm, as quedas nos valores de **Abs254f** e **Abs440f**, foram de 75,2% e 91,9%, respectivamente. Numa comparação do tratamento biológico com tratamentos físico-químicos, os valores de redução de matéria orgânica nas amostras brutas para o ensaio na maior temperatura e vazão específica de aeração deste trabalho foram maiores que os encontrados por Morocho-Jácome et al., 2016b, em trabalho onde usaram sulfato férrico como agente coagulante, em associação com carvão ativado em pó (remoção da ordem de 68% de matéria orgânica, determinada como **Abs254**), embora menores que os resultados com o emprego de cloreto férrico, associado com carvão ativado em pó (remoção da ordem de 92% de matéria orgânica, determinada como **Abs254**) (MOROCHO-JÁCOME et al., 2016a). Com relação aos pigmentos, os resultados (medidos em ambos os trabalhos como **Abs440**) a diferença na capacidade de remoção foi muito pequena (87,5% neste trabalho e 95,3 % no trabalho de Morocho-Jacome et al., 2016a). Essa diferença no comportamento da remoção de matéria orgânica e pigmentos mostra a facilidade que as bactérias presentes no meio apresentam para degradar os pigmentos ou até mesmo para uso em suas células (RAMESH et al., 2022), enquanto no caso da matéria orgânica, por grande parte ser constituída de polímeros, seria de mais difícil metabolização, embora os dados de remoção deste trabalho indiquem que esta metabolização ocorreu. Adicionalmente, outra possibilidade para os dados de menor remoção de matéria orgânica no meio bruto (sem filtração), é que a própria célula bacteriana em suspensão contribua para o valor medido de absorvância. Em outras palavras, a matéria orgânica que era um polímero foi transformada em célula. Mas considerando que as células oxidam o carbono orgânico para seu crescimento e manutenção, é certo que parte do carbono orgânico do sistema é convertido em dióxido de carbono (CARVALHO et al. 2015), que é arrastado pela aeração do sistema.

Tabela 4. Meio residual constituído da mistura dos meios finais (tempo correspondente a 72 horas) submetidos aos diferentes tratamentos biológicos

Condições de Tratamento biológico	Absorbâncias médias em 254 e 440 nm de amostras brutas e filtradas
<p style="text-align: center;">30 °C 0,1 vvm</p>	Abs_{254b} : 0,579 ± 0,002
	Abs_{440b} : 0,175 ± 0,006
	Abs_{254f} : 0,261 ± 0,004
	Abs_{440f} : 0,012 ± 0,003
<p style="text-align: center;">30 °C 1,0 vvm</p>	Abs_{254b} : 0,489 ± 0,011
	Abs_{440b} : 0,104 ± 0,006
	Abs_{254f} : 0,232 ± 0,005
	Abs_{440f} : 0,011 ± 0,003
<p style="text-align: center;">37 °C 0,1 vvm</p>	Abs_{254b} : 0,443 ± 0,003
	Abs_{440b} : 0,082 ± 0,003
	Abs_{254f} : 0,213 ± 0,003
	Abs_{440f} : 0,014 ± 0,002
<p style="text-align: center;">37 °C 1,0 vvm</p>	Abs_{254b} : 0,419 ± 0,001
	Abs_{440b} : 0,065 ± 0,005
	Abs_{254f} : 0,203 ± 0,016
	Abs_{440f} : 0,011 ± 0,004

Na comparação com sistemas de filtração tangencial, ou seja, tratamento com membranas, mesmo no tratamento com menor temperatura e vazão específica de aeração deste trabalho (30 °C e 0,1 vvm), houve praticamente equivalência de remoção de material orgânico, se comparado com testes realizados com tratamentos de meios utilizando microfiltração e/ou ultrafiltração descrito na literatura. De fato, Camargo de Jesus (2016) obteve remoção de 53,9 % de matéria orgânica (determinada como **Abs₂₅₄**), muito próximo da remoção de matéria orgânica obtida

neste trabalho (remoção de **Abs_{254b}** de 55,6 % nas condições de tratamento de 37°C e 1,0 vvm). No entanto, a técnica de tratamento por membranas foi eficiente na remoção de pigmentos (remoção de aproximadamente 93 % destes componentes), valor de remoção em amostras brutas deste trabalho que somente foi possível de ser alcançado valor próximo com o emprego das condições mais enérgicas de temperatura e vazão específica de aeração (37 °C e 1 vvm), e, principalmente, nas amostras filtradas, indicando que o material orgânico particulado apresenta capacidade de adsorção dos pigmentos presentes nos meios de cultivo.

5.2.3.2. Crescimento bacteriano, aumento de pH, concentrações de amônia e nitrato de sódio ao final dos ensaios principais de tratamento biológico

O meio residual proveniente do crescimento de *A. braunii* em fotobiorreator tubular (item 5.1) apresentou uma contagem bacteriana de $5,20 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Com base nos principais experimentos de tratamento biológico realizados, pôde-se verificar que as contagens de células bacterianas nas amostras tratadas a 37 °C com 72 horas de tratamento (Tabela 5) se mantiveram semelhante às contagens nas mesmas condições feitas nos ensaios preliminares (Tabela 2), independentemente das diferentes vazões específicas de aeração. Já nos ensaios em que as amostras de meio residuais foram submetidas a tratamento biológico a 30 °C, pôde-se perceber um número menor dos valores de UFC mL⁻¹ aos finais do experimento, também mesmo nas duas diferentes aerações aplicadas, possivelmente em virtude de ter sido usada uma temperatura mais baixa nestes ensaios, que não foi tão eficaz para promover uma maior taxa de divisão celular desses microrganismos, estando em fase de limitação energética para aumentar as velocidades enzimáticas, e, portanto, a velocidade de crescimento (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2007).

Nestes ensaios principais houve a repetição do comportamento quanto a essa diminuição de concentração celular e aumento de pH observado nos ensaios preliminares (item 5.2.2) e, com o objetivo de se verificar um possível causador do aumento destes valores, foram realizadas análises para se detectar presença de amônia no meio, que poderia estar associada ao metabolismo microbiano resultante da degradação de matéria orgânica protéica durante o tratamento biológico. Como pode-se constatar, através da Tabela 5, houve detecção da presença de amônia de maneira homogênea em todas as amostras tratadas, o que justificaria, então, este aumento de pH.

Tendo em vista que um dos objetivos deste trabalho foi desenvolver uma nova metodologia de tratamento para meios de cultivo de microrganismos fotossintetizantes, e que, após o tratamento, esses meios deveriam ter características de composição química semelhantes para se iniciar um novo cultivo de microalgas e promover seu crescimento, foram analisadas também as concentrações de nitrato de sódio em todas as amostras tratadas nas diferentes condições analisadas, pois o nitrato de sódio é fonte de nitrogênio, sendo um dos mais importantes nutrientes a ser dosado. Nos cultivos prévios em fotobiorreatores, parte desses sais certamente foi consumida durante o crescimento celular microalgal, sendo assim, a dosagem da concentração de nitrato de sódio foi feita para se avaliar o quanto sobrou após os processos de cultivo da microalga e tratamento biológico para que, com esses dados, pudesse ser possível saber o quanto dele seria necessário ser adicionado para enriquecer novamente o meio BOLD 3N para alcançar o valor de concentração do meio cultivo padrão BOLD 3N. De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que as concentrações de nitrato de sódio encontradas tiveram valores da ordem de 12 mg L^{-1} , valor baixo quando comparado à concentração desse nutriente em meio de cultivo novo, que corresponde a 750 mg L^{-1} , o que indica elevada taxa de consumo do mesmo durante as duas etapas de crescimento celular que ocorreram nele, ou seja, o crescimento celular microalgal em fotobiorreator seguido do crescimento bacteriano no tratamento biológico do meio residual. Esses dados claramente auxiliaram para que fossem feitos ajustes do teor desse nutriente em ensaios posteriores de cultivo da microalga nos meios tratados (item 5.2.5).

O processo de tratamento biológico adotado como modelo para avaliação da metodologia proposta foi o descontínuo, pois foi o primeiro a abordar este tipo de tratamento com vistas à reutilização de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes. Porém, sabe-se que existem outros processos que podem ser mais eficazes quando se leva em consideração uma aplicação industrial, como um processo contínuo, por exemplo, onde há eliminação de tempos mortos, sendo amplamente utilizado em tratamento de efluentes (SASSANO et al. 2007; REY-MARTÍNEZ et al., 2021). Com isso, pode-se garantir um processo constante de tratamento, fato que ajudaria a redução de custos e promover produção constante de meio tratado conforme vai sendo produzido meio residual constantemente também.

O uso de condensadores, constituídos por tubos de vidro de 0,5 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento acoplados cada um às tampas de cada frasco do reator, possibilitou uma menor perda de água evaporada causada pela elevação de temperaturas e aerações empregadas no processo de tratamento, dado também importante quando se buscar otimizar o processo.

Além de remover matéria orgânica e pigmentos, o processo de tratamento biológico proposto também contribuiu para a diminuição de carga microbiana presente nos meios quando comparado à carga microbiana no instante inicial ($5,20 \times 10^7$ UFC mL⁻¹), ou seja, o processo como um todo ainda auxilia na redução do volume de biomassa bacteriana, fato que facilitaria os processos subsequentes ao tratamento biológico para remoção de excesso de carga microbiana e, conseqüentemente, o reuso de meio de microrganismos fotossintetizantes.

Tabela 5. Valores finais médios, em tempo correspondente a 72 horas, de concentração celular bacteriana, valor de pH, concentrações de cloreto de amônio e de nitrato de sódio nos meios provenientes de cultivo de *A. braunii* submetidos a diferentes tratamentos biológicos.

Condições de Tratamento biológico	Concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹)	Valores de pH	Concentração de cloreto de amônio (mg L⁻¹)	Concentração de nitrato de sódio (mg L⁻¹)
30 °C 0,1 vvm	$5,96 \times 10^6 \pm 7,09 \times 10^4$	$8,5 \pm 0,0$	$7,56 \pm 0,06$	$12,43 \pm 0,30$
30 °C 1,0 vvm	$5,72 \times 10^6 \pm 6,66 \times 10^5$	$8,5 \pm 0,0$	$7,97 \pm 0,06$	$11,88 \pm 0,56$
37 °C 0,1 vvm	$1,64 \times 10^7 \pm 5,57 \times 10^5$	$9,0 \pm 0,0$	$8,05 \pm 0,02$	$11,08 \pm 1,20$
37 °C 1,0 vvm	$1,52 \times 10^7 \pm 7,37 \times 10^5$	$9,0 \pm 0,0$	$8,01 \pm 0,04$	$12,86 \pm 0,05$

5.2.4. Pós-tratamento

As principais vantagens de se empregar um tratamento biológico em um efluente são o menor custo de operação e manutenção de todo o sistema. Contudo, a presença de matéria orgânica residual em suspensão, nutrientes e biomassa bacteriana que ainda podem estar presentes nesse efluente tratado podem ser um problema, dependendo do uso posterior que se fará do mesmo. Para melhorar estas questões, é necessário a adoção de um sistema de pós-tratamento que tem como objetivo diminuir ainda mais esses elementos ali presentes para que se atenda os padrões necessários para cada tipo de efluente (VASHI et al., 2019).

Diferentes técnicas de pós-tratamento dos meios de cultivo tratados biologicamente foram analisadas como forma de reduzir ainda mais as quantidades de matéria orgânica suspensa e/ou solúvel residual que não foi metabolizada pelos microrganismos presentes no meio quando do tratamento biológico, bem como reduzir a carga bacteriana remanescente para, assim, se evitar uma competição por nutrientes, pois as bactérias, em quantidades excessivas em meio residual, poderiam crescer nele, podendo prejudicar o crescimento dos microrganismos fotossintetizantes em um novo cultivo com esse meio tratado. O pós-tratamento do meio que passou pelo tratamento biológico poderia contribuir para que ele apresentasse maior similaridade com o meio de cultivo BOLD 3N novo, o que poderia favorecer o crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em um novo cultivo. Dessa forma, neste trabalho, optou-se por duas técnicas que poderiam ser utilizadas em larga escala, que é a centrifugação e o tratamento com carvão ativado em pó. Neste caso particularmente, após o tratamento com carvão, haveria ainda a necessidade de centrifugação para a separação do carvão, os materiais nele adsorvidos, bem como outros materiais particulados e as células ali presentes.

5.2.4.1. Centrifugação

O processo de centrifugação como método físico de separação de todo material em suspensão nos meios tratados biologicamente foi o método mais rápido a ser testado como forma de etapa de pós-tratamento, pois consistiu em apenas uma operação unitária. Com isso, foi avaliada a capacidade do método de remover, de maneira mais refinada, ainda mais as concentrações de matéria orgânica, pigmentos, células bacterianas e outros materiais particulados em suspensão, os quais não foram removidos no tratamento biológico, tornando o meio tratado mais adequado para reuso em cultivo de *Ankistrodesmus braunii*.

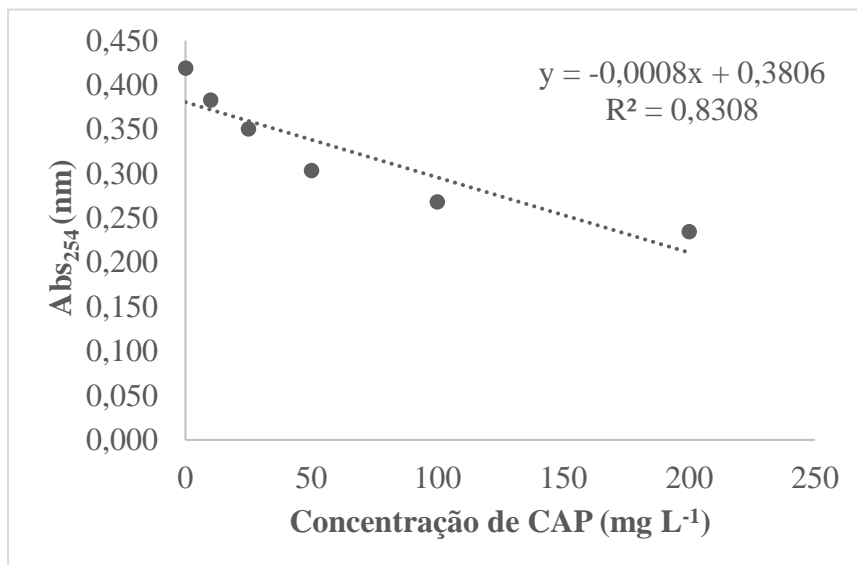
5.2.4.2. Tratamento com carvão ativado em pó (CAP)- teste preliminar para verificar a eficiência de remoção de matéria orgânica e pigmentos

A presença de matéria orgânica residual no meio de cultivo pode ser prejudicial para o crescimento de microrganismos fotossintetizantes, como já discutido anteriormente, por conta de alguns fatores e, dentre eles, pode-se destacar o efeito de sombreamento no volume total do meio, fato que diminui a eficiência fotossintética de microalgas e cianobactérias. Como metodologia para reduzir ainda mais a concentração de matéria orgânica que não foi processada nos tratamentos biológicos previamente, o uso de CAP foi avaliado, tendo em vista que o mesmo apresenta alta capacidade de adsorção. De fato, este componente é de grande importância industrial na remoção de pigmentos em purificação de produtos obtidos por cultivo microbiano, removendo pigmentos residuais presentes no produto em fase de purificação. Na área de cultivo de microalgas, foi utilizado com sucesso para remoção de pigmentos de vinhaça tratada por processo aeróbico com a finalidade de que ela pudesse ser utilizada como meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes, porém, devido à natureza do material de origem (vinhaça) houve a necessidade de utilização de concentrações da ordem de mil vezes os valores utilizados neste trabalho (MEJIA-SILVA, 2020).

Uma análise prévia de diferentes concentrações de CAP, com base em Morocho-Jácome et al. (2016a), foi feita com o objetivo de tomar conhecimento de qual concentração de CAP mínima seria necessária para adsorver o máximo de matéria orgânica presente nos meios tratados. Amostras de meio tratado a 37 °C, 1,0 vvm e 72 horas foram submetidas a diferentes dosagens de CAP, sendo elas 0, 10, 25, 50, 100 e 200 mg L⁻¹. Para se avaliar a capacidade de adsorção de matéria orgânica e pigmentos do CAP homogeneizado às amostras, leituras de **Abs₂₅₄** e **Abs₄₄₀** foram realizadas para tal finalidade. Na Tabela 6 pode-se observar que há redução de matéria orgânica, com o decaimento de **Abs₂₅₄**, porém o teor de pigmentos, medido por **Abs₄₄₀**, não obteve diminuição significativa. A relação da queda dos valores de **Abs₂₅₄** e as diferentes concentrações de CAP podem ser visualizadas nas Figuras 12 e 13. Nelas, claramente pode-se constatar que para o aumento da concentração de CAP até o valor de 50 mg L⁻¹ foi mantida a inclinação de decaimento da quantidade de matéria orgânica nas amostras, condição esta que não foi mantida com concentrações de CAP de 100 e 200 mg L⁻¹. Dessa forma, a concentração de CAP de 50 mg L⁻¹ foi utilizada nos ensaios principais de pós-tratamento proposto por este trabalho.

Tabela 6. Determinação da concentração de CAP a ser usada no pós-tratamento.

Concentração de CAP (mg L ⁻¹)	Abs ₂₅₄ (nm)	Abs ₄₄₀ (nm)
0	0,419 ± 0,001	0,071 ± 0,004
10	0,384 ± 0,015	0,052 ± 0,003
25	0,350 ± 0,004	0,056 ± 0,012
50	0,303 ± 0,002	0,060 ± 0,007
100	0,268 ± 0,0009	0,044 ± 0,001
200	0,234 ± 0,002	0,052 ± 0,003

Figura 12. Abs₂₅₄ em função da Concentração de CAP.

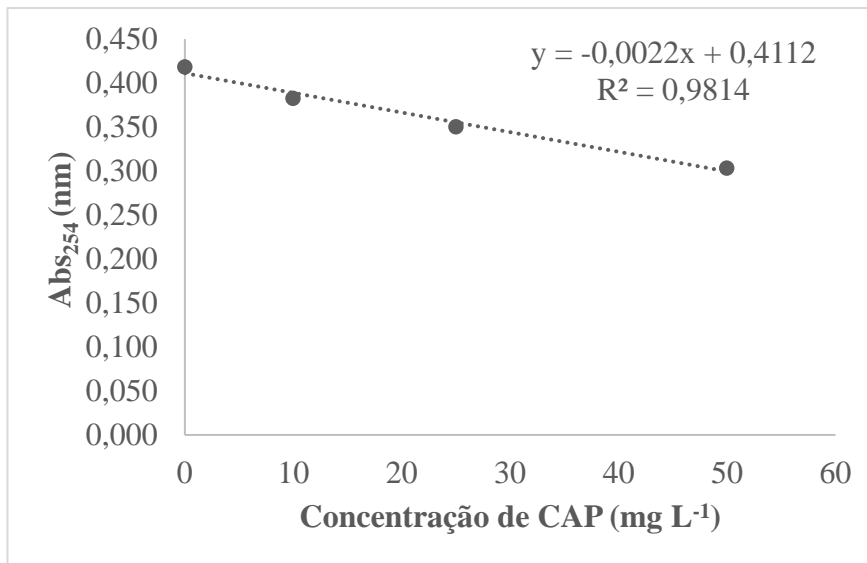


Figura 13. Abs₂₅₄ em função da Concentração de CAP, evidenciando a linearidade da queda da quantidade de matéria orgânica para concentração de CAP até 50 mg L⁻¹ ($R^2 = 0,9814$).

5.2.4.3. Resultados dos pós-tratamentos

Como forma de se verificar as características físico-químicas dos meios submetidos aos processos de pós-tratamento e, assim, ser possível constatar a eficácia dos processos isoladamente e em conjunto, bem como também avaliar os ajustes de nutrientes e pH necessários para um novo cultivo de microalgas, foram medidos os valores de pH, contagem bacteriana, Abs₂₅₄, Abs₄₄₀ (ambas brutas e filtradas), nitrato de sódio e amônia nos meios que sofreram o pós-tratamento somente de centrifugação ou que passaram pelo tratamento com CAP seguido de centrifugação. Todos estes valores, expressos em suas médias com seus respectivos desvios padrão, podem ser vistos nas Tabelas 7 a 10.

Como pode ser observado com os resultados obtidos, há diminuição dos valores de **Abs_{254b}** e **Abs_{440b}** (amostras brutas) em todas as diferentes amostras no pós-tratamento com centrifugação quando comparados aos valores de amostras brutas não submetidas a processos de pós-tratamento. Já os dados obtidos das amostras brutas que sofreram pós-tratamento com CAP seguido de centrifugação esses valores diminuíram mais ainda, ressaltando o poder de adsorção do CAP como elemento capaz de executar uma etapa a mais no processo de remoção de partículas do meio. Já nas amostras filtradas que passaram pelas metodologias de pós-tratamento propostas, não houve redução significativa ou não houve redução dos valores de

Abs254 e **Abs440**, indicando que os processos de centrifugação e tratamento do CAP seguido de centrifugação não foram capazes de remover mais matéria orgânica e pigmentos do que o que já havia sido removido pelos processos de filtração por membrana filtrante das amostras previamente.

Já os valores das concentrações de nitrato de sódio e cloreto de amônio não sofreram alterações significativas quando comparados aos valores obtidos das amostras que não passaram pelos processos de pós-tratamento por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação. O pH sofreu decréscimo de 9,0 para 8,5 em todas as amostras submetidas ao pós-tratamento, mas ainda se mantendo na faixa de valores alcalinos. A concentração celular bacteriana não sofreu decréscimo de valor, independentemente do pós-tratamento utilizado, seja ele a centrifugação ou o tratamento com CAP seguido de centrifugação.

Tabela 7. Resultados de pós-tratamento (valor de pH, concentração celular bacteriana, matéria orgânica, pigmentos, nitrato de sódio, cloreto de amônio) por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 30 °C e 0,1 vvm.

Amostras submetidas a tratamento biológico a 30 °C e 0,1 vvm.	Centrifugação	Tratamento com CAP seguido de centrifugação
pH	8,5 ± 0,0	8,5 ± 0,0
Concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹)	1,12 x 10 ⁷ ± 5,43 x 10 ⁴	1,10 x 10 ⁷ ± 6,59 x 10 ⁴
Abs254b	0,386 ± 0,006	0,288 ± 0,037
Abs254f	0,248 ± 0,003	0,221 ± 0,092
Abs440b	0,059 ± 0,003	0,052 ± 0,022
Abs440f	0,010 ± 0,002	0,011 ± 0,003
Nitrato de sódio (mg L⁻¹)	13,89 ± 1,03	13,28 ± 0,80
Cloreto de amônio (mg L⁻¹)	7,54 ± 0,06	6,86 ± 0,04

Tabela 8. Resultados de pós-tratamento por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 30 °C e 1,0 vvm.

Amostras submetidas a tratamento biológico a 30 °C e 1,0 vvm.	Centrifugação	Tratamento com CAP seguido de centrifugação
pH	8,5 ± 0,0	8,5 ± 0,0
Concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹)	1,05 x 10 ⁷ ± 6,79 x 10 ⁴	1,02 x 10 ⁷ ± 3,22 x 10 ⁴
Abs_{254b}	0,407 ± 0,006	0,291 ± 0,039
Abs_{254f}	0,253 ± 0,003	0,220 ± 0,091
Abs_{440b}	0,060 ± 0,002	0,054 ± 0,025
Abs_{440f}	0,010 ± 0,002	0,009 ± 0,002
Nitrato de sódio (mg L⁻¹)	15,54 ± 0,92	10,68 ± 2,34
Cloreto de amônio (mg L⁻¹)	8,04 ± 0,02	6,91 ± 0,06

Tabela 9. Resultados de pós-tratamento por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 37 °C e 0,1 vvm.

Amostras submetidas a tratamento biológico a 37 °C e 0,1 vvm.	Centrifugação	Tratamento com CAP seguido de centrifugação
pH	8,5 ± 0,0	8,5 ± 0,0
Concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹)	1,45 x 10 ⁷ ± 2,33 x 10 ⁴	1,57 x 10 ⁷ ± 5,47 x 10 ⁴
Abs_{254b}	0,386 ± 0,015	0,313 ± 0,082
Abs_{254f}	0,182 ± 0,006	0,165 ± 0,065
Abs_{440b}	0,056 ± 0,004	0,045 ± 0,020
Abs_{440f}	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,002
Nitrato de sódio (mg L⁻¹)	12,54 ± 1,77	11,43 ± 0,89
Cloreto de amônio (mg L⁻¹)	8,06 ± 0,04	7,14 ± 0,06

Tabela 10. Resultados de pós-tratamento por centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação de amostras tratadas biologicamente a 37 °C e 1,0 vvm.

Amostras submetidas a tratamento biológico a 37 °C e 1,0 vvm.	Centrifugação	Tratamento com CAP seguido de centrifugação
pH	8,5 ± 0,0	8,5 ± 0,0
Concentração celular bacteriana (UFC mL⁻¹)	1,90 x 10 ⁷ ± 5,44 x 10 ⁴	1,10 x 10 ⁷ ± 7,25 x 10 ⁴
Abs_{254b}	0,386 ± 0,011	0,300 ± 0,047
Abs_{254f}	0,238 ± 0,003	0,216 ± 0,092
Abs_{440b}	0,051 ± 0,004	0,048 ± 0,021
Abs_{440f}	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001
Nitrato de sódio (mg L⁻¹)	11,21 ± 0,97	12,43 ± 1,24
Cloreto de amônio (mg L⁻¹)	8,02 ± 0,05	7,13 ± 0,10

5.2.5. Cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a tratamento biológico

Esta etapa teve como finalidade validar os tratamentos biológicos propostos como formas de se promover reuso dos meios de cultivo residuais provenientes de um cultivo inicial de *Ankistrodesmus braunii*. Todos os ensaios foram realizados em agitadores rotativos como forma de se acompanhar crescimento celular microalgal dentro das condições ideais para a mesma, utilizando os meios de cultivo tratados sob as condições de:

- a) 30 °C e 0,1 vvm, centrifugado (Ensaio S1)
- b) 30 °C e 0,1 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S2)
- c) 30 °C e 1,0 vvm, centrifugado (Ensaio S3)
- d) 30 °C e 1,0 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S4)
- e) 37 °C e 0,1 vvm, centrifugado (Ensaio S5)
- f) 37 °C e 0,1 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S6)

- g) 37 °C e 1,0 vvm, centrifugado (Ensaio S7)
- h) 37 °C e 1,0 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S8)

Diferentes amostras padrão foram feitas com objetivo de comparar os resultados obtidos. Como padrões, tivemos:

- a) Meio BOLD 3N novo (Ensaio B1)

Este ensaio teve como finalidade ser o padrão clássico de crescimento da microalga para ser comparado aos cultivos com meios tratados biologicamente (Ensaio S1 a S4), bem com o meio residual que não sofreu tratamento, como descrito a seguir (Ensaio NT)

- b) Meio BOLD 3N novo + cloreto de amônio (Ensaio B2)

A adição de cloreto de amônio em um dos padrões teve como objetivo saber se haveria favorecimento nutricional (fonte de nitrogênio extra) para a microalga cultivada nos pós-cultivos, já que como resultado dos processos de tratamento biológicos avaliados houve, em todos os ensaios, a produção de um teor de amônia, provavelmente resultante do metabolismo bacteriano da degradação de matéria orgânica residual.

- c) Meio residual (sem tratamento) com adição de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (Ensaio NT)

Este ensaio foi realizado para verificar se haveria realmente a necessidade de tratamento do meio residual do cultivo. Caso o crescimento neste meio fosse igual ao obtido nos ensaios com meio BOLD 3N novos (Ensaio B1 e B2) ou nos meios tratados biologicamente (Ensaio S1 a S4), ficaria evidenciada a não necessidade de tratamento do meio de cultivo de *A. braunii* cultivado anteriormente para reuso em novo ciclo de produção.

5.2.5.1. Ajustes dos meios de cultivos tratados e padrões

Todos os meios padrões e tratados avaliados nos cultivos de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotativo para acompanhamento de crescimento da respectiva microalga foram ajustados quanto ao valor de pH e adição de fonte de nitrogênio para viabilizar sua multiplicação dentro das condições padrão que são necessárias para tal. Assim, foi possível

descartar qualquer interferência por parte desses parâmetros, que estão diretamente relacionados à sua capacidade de crescimento.

Como as concentrações de NaNO_3 encontradas nos meios após os cultivos iniciais de *Ankistrodesmus braunii* em fotobiorreator e após tratamentos foram muito pequenas, em virtude do consumo pela microalga, foi necessária a adição desta fonte de nitrogênio em todos os meios, tanto em meios de referência (padrões) quanto nos tratados, até a concentração equivalente à concentração padrão do meio BOLD 3N.

A presença de amônia, expressa como cloreto de amônio, em todas as amostras tratadas biologicamente fez necessário o cultivo da microalga em um padrão contendo este elemento, como forma de se comparar a multiplicação celular microalgal das amostras tratadas com a multiplicação em um meio BOLD 3N novo com a adição deste sal. Sendo assim, o ajuste foi feito de modo a se ter, no meio padrão respectivo, um teor equivalente médio ao teor encontrado em todas as amostras tratadas.

O valor de pH também necessitou ser corrigido, já que a microalga *Ankistrodesmus braunii* cresce bem em valores de pH na faixa de $7,0 \pm 0,5$. Como ao final de todos os processos de tratamento biológico e pós-tratamento os valores de pH estiveram em $8,5 \pm 0,0$, a diminuição do pH para o valor de $7,0 \pm 0,5$ foi feita através de acidificação dos meios por injeção de dióxido de carbono.

5.2.5.2. Resultados dos cultivo de *Ankistrodesmus braunii* em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a tratamento biológico e padrões

Os cultivos de *Ankistrodesmus braunii* em agitadores rotativos em todos os meios tratados e padrões, com exceção do padrão composto por meio residual adicionado nitrato de sódio (Ensaio NT), que não apresentou crescimento, obtiveram crescimento da microalga, sendo o valor máximo médio alcançado de $1352 \pm 46,5$ (Tabela 11) no sexto dia dos ensaios contendo meio tratado a $30\text{ }^\circ\text{C}$ e 1,0 vvm e pós-tratado com centrifugação. Contudo, não foi possível constatar diferença de concentração celular máxima nos meios que sofreram diferentes tratamentos (ANOVA, $p = 0,4219$), sendo possível ver um comportamento homogêneo de crescimento celular microalgal em todos os experimentos.

Assim, pode-se verificar que os processos de tratamento biológico, mesmo apresentando remoções de matéria orgânica e pigmentos em diferentes proporções em cada condição empregada, não alteraram o crescimento da microalga em agitador rotativo. Os processos de pós-tratamento de tratamento com CAP seguido de centrifugação também não tiveram influência significativa nas taxas de crescimento de *Ankistrodesmus braunii*, mesmo eles sendo processos que auxiliaram na remoção de uma fração a mais de compostos orgânicos residuais ali previamente presentes.

Com isso, é possível constatar que mesmo o meio de cultivo BOLD 3N residual sendo submetido a tratamento biológico a 30 °C e 0,1 vvm e pós-tratamento por centrifugação (condições mínimas) foi capaz de promover crescimento celular da microalga em um novo cultivo de maneira equivalente aos demais tratamentos e pós-tratamentos. Do ponto de vista do custo de operação em uma escala maior esse dado poder ser interessante, já que com o uso de temperatura e vazão específica de aeração menores (30 °C e 0,1 vvm) consegue-se obter a mesma taxa de crescimento celular microalgal em um novo cultivo que os processos que trataram os meios com uso de temperatura e vazão específica de aeração maiores. O uso de CAP como etapa de pós-tratamento se mostrou interessante do ponto de vista de remoção de frações um pouco maiores de resquícios de matéria orgânica dos meios tratados, mas também não se fez essencial para obtenção de crescimento celular microalgal, já que amostras que foram somente centrifugadas obtiveram praticamente os mesmos valores de X_m que as amostras tratadas com CAP seguidas de centrifugação.

Já os ensaios em agitador rotativo que utilizaram meio BOLD 3N residual ou seja, sem tratamento, somente sendo enriquecido com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, não obtiveram crescimento celular de *Ankistrodesmus braunii*, fato que pode ser observado com o decaimento do valor de concentração celular do instante 0, de $260 \pm 11,9$ até o instante 7 que foi de 43 ± 11 . (Tabela 11). Pode-se constatar que mesmo se enriquecendo o meio residual, que não foi submetido a processo de tratamento biológico, com o principal nutriente necessário para favorecer o crescimento da microalga, não foi suficiente para se obter multiplicação celular da mesma. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que a matéria orgânica solúvel em excesso, juntamente com a alta concentração celular bacteriana ali presente tem influência direta e negativa no crescimento de *Anksitrodesmus braunii*, fato que ressalta a importância de se empregar uma metodologia de tratamento para reuso não só para se evitar o descarte de água, sais e compostos orgânicos no meio ambiente,

mas também para que um novo cultivo seja viável para produção de biomassa deste microrganismo fotossintetizante.

Na Figuras 14 e 15 podem ser visualizadas as características dos meios BOLD 3N residual enriquecido de nitrato de sódio em comparação aos diferentes meios tratados, centrifugados e tratados com CAP seguido de centrifugação. Já na Figura 16 é possível ver a presença de crescimento celular microalgal nos ensaios em agitador rotativo usando meios tratados a 30 °C e 0,1 vvm com pós-tratamento de centrifugação e tratamento com CAP seguido de centrifugação em comparação aos crescimentos nos padrões BOLD 3N novo e BOLD 3N com adição de cloreto de amônio. Uma amostra do ensaio que utilizou meio BOLD 3N residual, sem tratamento, somente adicionado nitrato de sódio como fonte de nitrogênio também pode ser vista como forma de demonstrar a ausência de crescimento celular da microalga nele.

Tabela 11. Concentração de biomassa (mg L^{-1}) dos cultivos de *Ankistrodesmus braunii* em meios de cultivo BOLD 3N submetidos a diferentes padrões (Ensaio NT, B1 e B2) e tratamentos biológicos (Ensaio S1 a S8)*.

Tempo (dias)	Ensaio NT	Ensaio B1	Ensaio B2	Ensaio S1	Ensaio S2	Ensaio S3	Ensaio S4	Ensaio S5	Ensaio S6	Ensaio S7	Ensaio S8
0	260 ± 11,9	256 ± 2,2	237 ± 21,5	245 ± 12,5	251 ± 10,3	238 ± 23,5	247 ± 20,6	256 ± 34,9	307 ± 29,5	226 ± 9,8	271 ± 10,3
1	238 ± 22,8	278 ± 40,7	303 ± 30,3	325 ± 28,1	310 ± 31,7	273 ± 38,4	297 ± 42,8	387 ± 21,7	360 ± 17,9	334 ± 39,0	381 ± 22,8
2	217 ± 33,1	287 ± 68,4	311 ± 36,2	237 ± 17,9	302 ± 28,1	333 ± 35,7	332 ± 35,3	364 ± 38,4	335 ± 25,9	334 ± 36,2	365 ± 15,7
3	212 ± 37,2	361 ± 26,5	345 ± 21,7	268 ± 11,7	348 ± 14,0	345 ± 7,8	369 ± 9,0	361 ± 18,4	374 ± 21,5	360 ± 10,3	369 ± 20,0
4	80 ± 19,5	573 ± 32,4	617 ± 25,5	573 ± 13,7	594 ± 24,3	359 ± 12,5	594 ± 24,3	735 ± 73,6	698 ± 50,2	593 ± 29,8	615 ± 19,2
5	79 ± 22,2	1338 ± 31,9	1300 ± 14,7	1309 ± 20,0	1299 ± 31,9	635 ± 16,2	1298 ± 55,7	1329 ± 56,5	1290 ± 27,4	1285 ± 19,6	1312 ± 16,2
6	59 ± 19,6	1261 ± 29,8	1314 ± 14,7	1277 ± 19,2	1308 ± 31,9	1352 ± 46,5	1305 ± 33,5	1286 ± 21,5	1238 ± 14,7	1270 ± 27,4	1283 ± 14,0
7	43 ± 11	1255 ± 21,5	1305 ± 20,6	1302 ± 18,2	1300 ± 18,8	1343 ± 62,6	1295 ± 5,3	1290 ± 13,4	1229 ± 38,5	1266 ± 12,1	1270 ± 9,0

*Cultivos realizados em triplicata com os seguintes meios: meio não tratado (Ensaio NT); meio novo BOLD 3N (Ensaio B1); meio novo BOLD 3N, com adição de cloreto de amônio (Ensaio B2); 30 °C e 0,1 vvm, centrifugado (Ensaio S1); 30 °C e 0,1 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S2); 30 °C e 1,0 vvm, centrifugado (Ensaio S3); 30 °C e 1,0 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S4); 37 °C e 0,1 vvm, centrifugado (Ensaio S5); 37 °C e 0,1 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S6); 37 °C e 1,0 vvm, centrifugado (Ensaio S7); 37 °C e 1,0 vvm, tratado com CAP e centrifugado (Ensaio S8).

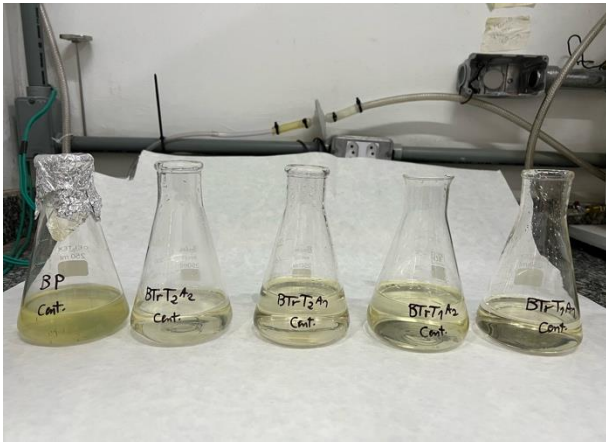


Figura 14. Amostras de meio BOLD 3N residual e meios BOLD 3N tratados em diferente temperaturas e aerações submetidos a centrifugação.



Figura 15. Amostras de meio BOLD 3N residual e meios BOLD 3N tratados em diferente temperaturas e aerações submetidos a tratamento com CAP seguido de centrifugação.

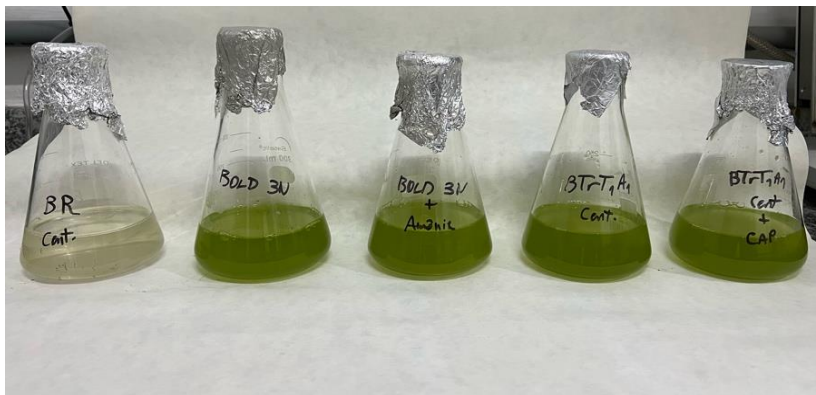


Figura 16. Amostras de meio BOLD 3N residual, meio BOLD 3N novo e BOLD 3N com adição de cloreto de amônio e meios BOLD 3N tratados a 30 °C e 0,1 vvm após cultivo de *Anastrodesmus braunii* em shaker no dia 7.

6. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho, foi possível chegar às seguintes conclusões:

- Foi possível obter remoção de matéria orgânica e pigmentos dos meios submetidos a diferentes condições de tratamento biológico proposto por este trabalho, fato que confirma a eficiência da metodologia desenvolvida.
- Foi possível constatar que o consumo de matéria orgânica e pigmentos foi realizada pelas bactérias presentes no meio e que vivem em co-cultura com *Ankistrodesmus braunii*, através do estímulo do crescimento das mesmas por uso de temperaturas de 30 °C e 37 °C e inserção de aerações de 0,1 vvm e 1,0 vvm.
- O aumento dos valores de pH em todos os meios submetidos às diferentes condições de tratamento biológico propostas demonstrou que a produção de amônia, resultante da metabolização de matéria orgânica pelas bactérias ali presentes foi, provavelmente, a causadora deste fenômeno, fato importante a se levar em consideração tendo em vista o reuso deste meio para cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, que necessita de um valor abaixo dos valores finais após tratamento.
- A dosagem das concentrações de nitrato de sódio dos meios residuais e tratados biologicamente demonstram a necessidade de se adicionar essa fonte de nitrogênio nos meios tratados como forma de garantir a eficiência do crescimento microalgal em cultivos posteriores.
- As contagens celulares bacterianas possibilitaram conhecer o comportamento de crescimento celular destas células durante o processo de tratamento biológico, demonstrando um pico de crescimento nas primeiras 24 horas seguido de decaimento e estabilização até 72 horas, fato em concordância também com a remoção de matéria orgânica e pigmentos do meio por elas.
- Apesar de haver valores melhores de remoção de matéria orgânica e pigmentos nos experimentos onde foram aplicadas temperaturas de 37 °C e 1,0 vvm nos tratamentos biológicos, foi possível confirmar que a utilização de meios tratados a 30 °C e 0,1 vvm para reuso em cultivos de *Ankistrodesmus braunii* já é satisfatória para obter crescimento da microalga, já que os valores de concentração celular máxima em ensaios em agitadores rotativos utilizando meios tratados em diferentes condições

apresentaram praticamente os mesmos resultados de crescimento microalgal, chegando a valores da ordem de 1220 a 1300 mg L⁻¹.

- O uso de CAP como etapa de pós-tratamento demonstrou eficácia na remoção de matéria orgânica residual ainda presente nos meios submetidos a tratamento biológico, porém não influenciou numa melhora das taxas de crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em agitador rotativo, podendo este processo não ser obrigatório para cultivo da microalga posteriormente.
- O tratamento biológico proposto demonstrou claramente como sendo uma metodologia promissora para tratamento de meio de cultivo de microrganismos fotossintetizantes com a finalidade de reuso em novos cultivos, justamente pela maior simplicidade de se conduzir o processo como um todo, por não haver necessidade de se adicionarem agentes externos ao sistema, como agentes flocculantes, por exemplo, e poderem ser empregadas temperaturas e aerações mais baixas (30°C e 0,1 vvm, respectivamente) dentre as avaliadas neste trabalho, fato que garante menor gasto energético.
- Os ensaios realizados forneceram dados consistentes quanto a eficácia de um tratamento biológico para meios de cultivo de microrganismos fotossintetizantes, dando subsídios para estudos futuros visando ao tratamento biológico de outros tipos de meio provenientes de cultivo de microrganismos fotossintetizantes, obtidos a partir de cultivos conduzidos com fotobiorreatores de diferentes configurações e diferentes tipos de processos de cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**. p. 1-12, 2009.

ANDRADE, M. da R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th ed. Washington, D.C., 1998.

ARORA, M.; ANIL, A. C.; DELANY, J.; RAJARAJAN, N.; EMAMI, K.; MESBAHI, E. Carbohydrate-degrading bacteria closely associated with *Tetraselmis indica*: influence on algal growth. **Inter-Research**, v. 15, p. 61-71, 2012.

BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; MARGUERI, M. C. Biologia fondamentale del genere *Spitulina*. In: Atti del convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, 1980, p. 49-82.

BEEFTINK, H.H.; HEIJDCN, R.T.J.M.; HEIJNEN, J.J. Maintenance requirements: energy supply from simultaneous endogenous respiration and substrate consumption. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, p. 203-210, 1990.

BIER, O. Microbiologia e Imunologia. Melhoramentos, São Paulo. 1984. 1234p.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Some soil algae from enchanted rock and related algae species. Phycological Studies IV. Austin, University of Texas Publications, n. 6318, p. 1-95, 1963.

BENNER, P.; MEIER, L.; PFEFFER, A.; KRÜGER, K.; VARGAS, J. E. O.; WEUSTER-BOTZ, D. Lab-scale photobioreactors systems: principles, applications and scalability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, p. 791-813, 2022.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae – their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743-756, 2013.

BORZANI, W. **Fermentação Semicontínua**. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher. v. 2, p. 219-222, 2001.

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. C-phycoyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives of Microbiology**, v. 125, p. 143-147, 1980.

BRANCO, S. M. Biologia do Tratamento de Esgotos. **Revista DAE**. v. 25, p. 99-115, 1964.

BRESAOLA, M. D. MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MATSUDO, M. C.; CARVALHO, J.C.M. Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 2197-2205, 2019.

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion Management**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.

CAI, J., LOVATELLI, A., AGUILAR-MANJARREZ, J., CORNISH, L., DABBADIE, L., DESROCHERS, A., DIFFEY, S., GARRIDO GAMARRO, E., GEEHAN, J., HURTADO, A., LUCENTE, D., MAIR, G., MIAO, W., POTIN, P., PRZYBYLA, C., REANTASO, M., ROUBACH, R., TAUATI, M. & YUAN, X. 2021. Seaweeds and microalgae: an overview for unlocking their potential in global aquaculture development. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1229. Rome, FAO. 2021. <https://doi.org/10.4060/cb5670en>.

CAMARGO DE JESUS, C. K. **Reaproveitamento de meio de cultivo de *Arthrospira platensis* tratado por processo de microfiltração e ultrafiltração**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

CARVALHO, J. C. M.; MATSUDO, M. C. BERZERRA, R. P.; SATO, S. **Tecnologia de fermentações**. In: VITOLO, M. Et al. (Org.). *Biotechnology Farmacêutica*. 1ed. São Paulo: Bluncher, 2015, v. 1, p. 103-156.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação descontínua alimentada**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed. *Biotechnology Industrial – Engenharia Bioquímica*. São Paulo – Edgar Blücher Ltda, 2001, v. 2, p. 205-218.

CARVALHO, J. C. M.; FRANCISCO, F. R.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 589-597, 2004.

CHAN, Y. J.; CHONG, M. F.; LAW, C. L.; HASSELL, D. G. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, p. 1-18, 2009.

COHEN, Z. **The chemical of *Spirulina***. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. p. 175-204.

COLE, J. J. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 291-314. 1982.

COLLA, L. M. et al. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, 2007.

D'ALESSANDRO, E. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 832-841, 2016.

DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O. CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 329-335, 2004.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and producing of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261-269, 2002.

DELATTRE, C.; PIERRE, G.; LAROCHE, C.; MICHAUD, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1159-1179, 2016.

DELRUE, F.; IMBERT, Y.; FLEURY, G.; PELTIER, G.; SASSI, J. F. Using coagulation-flocculation to harvest *Chlamydomonas reinhardtii*: Coagulant and flocculant efficiencies and reuse of the liquid phase as growth medium. **Algal Research**, v. 9, p. 283-290, 2015.

DEPRAETERE, O.; PIERRE, G.; NOPPE, W.; VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MICHAUD, P.; MUYLAERT, K. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. **Algal Research**, v. 10, p. 48-54, 2015.

EDZWALD, J. K.; BECKER, W. C.; WATTIER, K. L. Surrogate parameters for monitoring organic matter and THM precursors. **Research & Technology**, v. 77, p. 122-132, 1985.

FAINTUCH, B. L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. 1989. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

FERRARI, G. M.; TASSAN, S. A method using chemical oxidation to remove light absorption by phytoplankton pigments. **Journal of Phycology**, v. 35, p. 1090-1098, 1999.

FIORESI, T. B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (*Chlorophyta*) em laboratório a base de esterco suíno. **Biotermas**, v. 21, p. 7-16, 2008.

FLORES, C. C.; PENA-CASTRO, J. M.; FLORES-COTERA, L. B.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. **Interciencia**, v. 28, n. 8, p. 450-456, 2003.

FOGG, G. E. The extracellular products of algae. **Oceanography and Marine Biology Annual Review**, v. 4, p. 195-212, 1966.

FUSINATO, E.; FORMENTIN, J.; ESPINDOLA, J. G. **Rizóbios na qualidade do solo**. Universidade Estadual de Santa Catarina. 2013.

GOHARA-BEIRIGO, A. K.; MATSUDO, M. C.; CEZARE-GOMES, E. A.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Microalgae trends toward functional staple food incorporation: Sustainable alternative for human health improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 125, p. 185-199, 2022.

GOLDMAN, J.C.; DENNET, M. R.; RILEY, C.B. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgae cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 619-631, 1982.

GRANADOS, M. R.; ACIÉN, F. G.; GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GRIMA, E. M. Evaluation of flocculants for recovery of freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 102-110, 2012.

GROSSART, H. P.; CZUB, G.; SIMON, M. **Algae-bacteria interactions and their effects on aggregation and organic matter flux in the sea**. Institute of Chemistry and Biology of the Marine Environment. University of Oldenburg. p. 1074-1084, 2006.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. Algae Base. Version 4.2. World Wide Web Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. 2015. Encontrado em: <http://www.algaebase.org>

HOPKINS, W. G.; HUNER, N. P. A. Introduction to Plant Physiology, 4th Edition. Science. V. 4, 2009.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 495-504, 1993.

JOHN, D. M.; WHITTON, B.A.; BROOK, A.J. **The freshwater alga flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae**. Cambridge: Cambridge University Press. p. 388, 2002.

KABSCH-KORBUTOWICZ, M. Effect of Al coagulant type on natural organic matter removal efficiency in coagulation/ultrafiltration process. **Desalination**. v. 185, p. 327-333, 2005.

KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. **Foods and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 60-84, 2018.

KIM, D. G.; LA, H. G.; AHN, C.Y.; PARK, Y. H.; OH, H. M. Harvest of *Scenedesmus* sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3163-3168, 2011.

KOROLEFF, F. **Determination of ammonia**. In: K. Grasshoff, M. Ehrhardt and F. Kremling (Editors), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 2nd ed., p. 150-157, 1983.

KUENTZEL, L. E. Bacteria, carbon dioxide and algal blooms. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 41, p. 1737-1747, 1969.

LEE, K.; LEE, S. Y.; PRAVEENKUMAR R.; KIM, B.; SEO, J. Y.; JEON, S. G.; NA, J. G.; PARK, J. Y.; KIM, D. M.; OH, Y. K. Repeated use of stable magnetic flocculant for efficient harvest of oleaginous *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 284-290, 2014.

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 307-315, 2001.

LIU, Q.; PENG, Y.; ZHAO, Y.; ZHAO, Q.; ZHANG, Q.; SUI, J.; CHUANXIN, W.; JIANWEI, L. Excellent anammox performance driven by stable partial denitrification when encountering seasonal decreasing temperature. **Bioresource Technology**, v. 364, 128041, 2022.

LOFTUS, S. E.; JOHNSON, Z. L. Cross-study analysis of factor affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production. **Algal Research**, v. 24, Part A, p. 154-166. 2017.

LU, Z.; LOFTUS, S.; SHA, J.; WANG, W.; PARK, M.; ZHANG, X.; JOHNSON, Z.; JU, Q. Water reuse for sustainable microalgae cultivation: current knowledge and future directions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 161, 104975, 2020.

MACHINENI, L. Review on biological wastewater treatment and resources recovery: attached and suspended growth systems. **Water Science & Technology**, v. 80, p. 2013-2026, 2019.

MAIER, R. M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press. P. 143-145, 2000.

MEJIA-DA-SILVA, L. C. **Avaliação do crescimento de micro-organismos fotossintetizantes em fotobiorreator tubular empregando nutrientes provenientes da vinhaça tratada**. 2020. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. 2020.

MEJIA-DA-SILVA, L. D. C.; MATSUDO, M. C.; MOROCHO-JÁCOME, A. L.; CARVALHO, J. C. M. Application of physicochemical treatment allows reutilization of *Arthrospira platensis* exhausted medium: An investigation of reusing medium in *Arthrospira platensis* cultivation. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 186, p. 40-53, 2018.

MIERZWA, J. C.; SILVA, M. C. C.; RODRIGUES, L. D. B.; HESPANHOL, I. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. *Engenharia Sanitária Ambiental*. V. 13, p. 78-87, 2008.

MOROCHO-JÁCOME, A.L.; MASCIOLI, G.F.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Ferric chloride flocculation plus carbon adsorption allows to reuse spent culture medium of *Arthrospira platensis*. **Engineering in Life Sciences**, v.15, n.2, p.208–219, 2015a.

MOROCHO-JÁCOME, A.L.; MASCIOLI, G.F.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* using exhausted medium treated with granular activated carbon. **Journal of Hydrology**, v. 522, p.467–474, 2015b.

MOROCHO-JÁCOME, A.L.; MASCIOLI, G.F.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Evaluation of physicochemical treatment conditions for the reuse of a spent growth medium in *Arthrospira platensis* cultivation. **Algal Research**, v.13, p.159–166, 2016a.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; SATO, S.; DE CARVALHO, J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in *Arthrospira platensis* cultivation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, p. 901-910, 2016b.

NAES, H.; POST, A. F. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatoria breves* induced by changes in nitrogen supply. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 333-337, 1988.

NETER, J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models: Regression, Analysis of Variance and Experimental Designs**. Richard D. Irwin. 1974

NATRAH, F.M.I.; BOSSIER, P.; SORGELOOS, P.; YUSOFF, F.M.; DEFOIRDT, T. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.6, p. 48–61. 2014.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; CAMACHO, R.; MERCADO, G. Production of *Spirulina sp.* in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoors raceways under temperate climatic conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 242-247, 1997.

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

PIRT, J. **Principles of microbe and cell cultivation**. John Wiley & Sons. New York. 1975. 274p.

RAFIQUE, M.; HAYAT, K.; MUKHTAR, T.; AMNA, KHAN, A. A.; AFRIDI, M. S.; HUSSAIN, T.; SULTAN, T.; MUNIS, M. F. H.; IMRAN, M.; CHAUDHARY, H. J. **Bacterial biofilm formation and its role against agricultural pathogens**. In: A. Mendez-Vilas. (Ed.). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Formatex. p. 373-382, 2015.

RAMESH, C.; PRASASTHA. V.R.; VENKATACHALAM. M.; DUFOSSÉ, L. Natural substrates and culture conditions to produce pigments from potential microbes in submerged fermentation. **Fermentation**, v. 8, p. 460, 2022.

REY-MARTÍNEZ, N.; BARREIRO-LOPEZ, A.; GUIASOLA, A.; BAEZA, J. A.. Comparing continuous and batch operation for high-rate treatment of urban wastewater. **Biomass and Bioenergy**, v. 149, p. 106077, 2021.

ROCHA, G. S.; PINTO, F. H. V.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 171-178, 2014.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4491-4498, 2010.

RUIZ, J.; OLIVIERI, G.; DE VREE, J.; BOSMA, R.; WILLEMS, P.; HANS REITH, J.; EPPINK, M. H. M.; KLEINEGRIS, D. M. M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M J. Towards Industrial Products from Microalgae. **Energy & Environmental Science**, v. 10, 2016.

SALAMA, E.; KIM, H.; ABOU-SHANAB, R.; JI, M.; OH, Y.; KIM, S.; JEON, B. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 36, p. 827-833, 2013.

SALEM, N.; EGGERSDORFER, M. Is the world supply of omega -3 fatty acids adequate for optimal human nutrition? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, p. 147, 2015.

SAMER, M. **Biological and Chemical Wastewater Treatment Processes**. In SAMER, M. (Ed.), *Wastewater Treatment Engineering*. 2015. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61250>

SÁNCHEZ-LUNA, L. D.; CARVALHO, J. M. C.; MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; CONVERTI, A.; SATO, S. Influence of pH, temperature and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* cultivation: A kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 702-711, 2007.

SANTO, E. E. **Avaliação da interação entre bactérias e microrganismos fotossintetizantes**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo. 2020.

SANTO, E. E.; ISHII, M.; PINTO, U.M.; MATSUDO, M.M.; CARVALHO, J.C.M. Obtaining bioproducts from the studies of signals and interactions between microalgae and bacteria. **Microorganisms**, v. 10, 2029, 2022.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A. ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, p. 593-598, 2007.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1732-1738, 2010.

SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e processos fermentativos**. In: SCHMIDELL NETO, W. ALMEIDA-LIMA U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Bluncher. V. 2, p. 179-192, 2001.

SEMBLANTE, G. U.; HAI, F. I.; NGO, H. H.; GUO, W.; YOU, S. J.; PRICE, W.; NGHIEM, N. D. Sludge cycling between aerobic, anoxic and anaerobic regimes to reduce sludge production during wastewater treatment: Performance, mechanisms and implications. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 395-409, 2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source of in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biologie Animals**, v. 41, n. 1, p. 25-31, 1996.

TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHANG, J. S.; LING, T. C.; LAN, J. C. W. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1219-1227, 2015.

TAWFIC, A.; BAKR, M. H.; NASR, M.; HAIDER, J.; MESFER, M. K. A.; LIM, H.; QYYUM, M. A.; LAM, S. S. Economic and environmental sustainability for anaerobic

biological treatment of wastewater from paper and cardboard manufacturing industry. **Chemosphere**, v. 289, 2022.

VILLEN, R.A. **Tratamento Biológico de Efluentes**. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*, vol. 3. Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

VASHI, N. V.; SHAH, N. C.; DESAI, K. R. Performance of UASB post treatment technologies for sewage treatment in Surat city. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 35, n. 4, p. 1352-1359, 2019.

WEISHAAR, J. L.; AIKEN, G. R.; BERGAMASCHI, B. A.; FRAM, M. S.; FUJII, R.; MOPPER, K. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. **Environmental Science & Technology**, v. 20, p. 4702-4708, 2003.

WILLIAMS, V. R.; McMILLAN, R. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. *Science*, v. 133, p. 459-460, 1961.

WISNIAK, J.; KORIN, E. **Supercritical fluid extraction of lipids and other materials from algae**. In: COHEN, Z.; RATLEDGE, C. (Ed.). *Single Cell Oils*. Champaign: AOCS Press. p. 220-238, 2005.

WU, Z.; ZHU, Y.; HUANG, W.; ZHANG, C.; LI, T.; ZHANG, Y.; LI, A. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 496-502, 2012.

XIAO, C.; LIAO, Q.; FU, Q.; HUANG, Y.; XIA, A.; SHEN, W.; CHEN, HAO.; ZHU, X. Exergy analyses of biogas production from microalgae biomass via anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 289, 121709, 2019.

YORKOR, B.; MOMOH, Y. O. L. A review of anoxic wastewater treatment: An overlooked aspect in wastewater treatment in Nigeria. *American Journal of Water Resources*, v. 7 (4), p. 136-145, 2019.

ZHANG, B.; PENG, C.; ZHANG, S.; ZHANG, M.; LI, D.; WANG, X.; MAO, B. Comprehensive analysis of the combined flocculation and filtration process for microalgae harvesting at various operating parameters. **Science of The Total Environment**. v. 857, 159658 2023.