



Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Programa Interunidades

unesp 

Mestrado

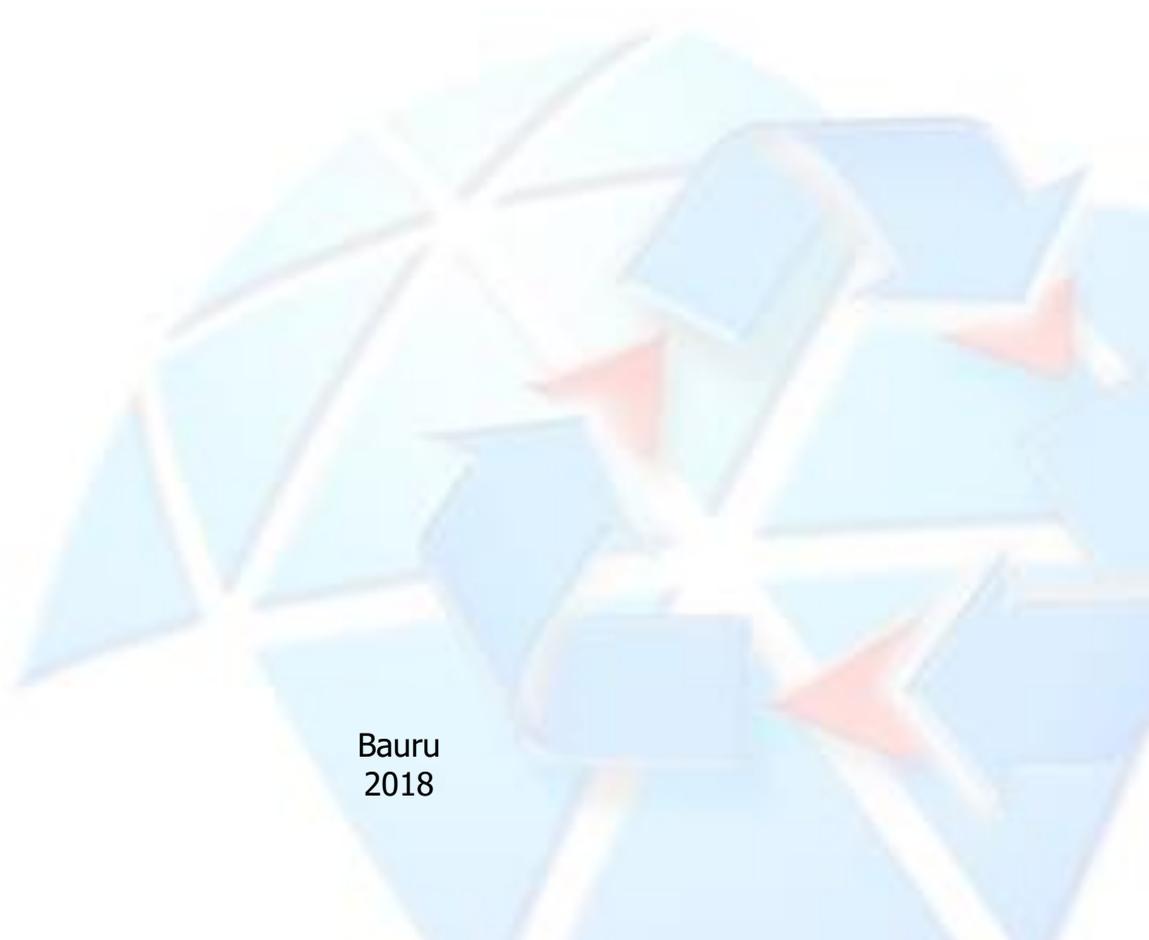
---

Engenharia Civil e Ambiental

**LETÍCIA SLOMPO**

**MICROALGAS COMO SOLUÇÃO PARA RECUPERAÇÃO DE  
NUTRIENTES PROVENIENTES DE ÁGUAS NEGRAS TRATADAS**

Bauru  
2018



**LETÍCIA SLOMPO**

**MICROALGAS COMO SOLUÇÃO PARA RECUPERAÇÃO DE  
NUTRIENTES PROVENIENTES DE ÁGUAS NEGRAS TRATADAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Área de Concentração: Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro da Silva

Coorientadora: Dr. Ana Paula Erbeta Sueitt

Bauru  
2018



Slompo, Leticia.

Microalgas como solução para a recuperação de  
nutrientes provenientes de águas negras tratadas/  
Leticia Slompo, 2018  
117 f. : il.

Orientador: Gustavo Henrique Ribeiro da Silva  
Coorientadora: Ana Paula Erbetta Sueitt

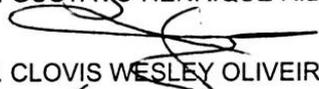
Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Engenharia, Bauru, 2018

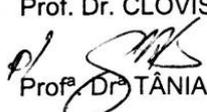
1. Água negra. 2. Microalgas. 3. Recuperação de  
nutrientes. 4. Saneamento ecológico. I. Universidade  
Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia. II.  
Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE LETÍCIA SLOMPO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL, DA FACULDADE DE ENGENHARIA - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 03 dias do mês de setembro do ano de 2018, às 09:00 horas, no(a) Sala de videoconferência (Prédio antigo DEE), reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE RIBEIRO DA SILVA - Orientador(a) do(a) Departamento de Engenharia Civil e Ambiental / Faculdade de Engenharia de Bauru - UNESP, Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA do(a) Departamento de Morfologia e Patologia / Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> TÂNIA VASCONCELOS FERNANDES do(a) Aquatic Ecology Department / Netherlands Institute of Ecology , sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de LETÍCIA SLOMPO, intitulada **MICROALGAS COMO SOLUÇÃO PARA RECUPERAÇÃO DE NUTRIENTES PROVENIENTES DE ÁGUAS NEGRAS TRATADAS**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADA \_\_\_\_\_. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE RIBEIRO DA SILVA

  
Prof. Dr. CLOVIS WESLEY OLIVEIRA DE SOUZA

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> TÂNIA VASCONCELOS FERNANDES

## AGRADECIMENTOS

À minha família por todo apoio para que meus estudos estivessem sempre em primeiro lugar, sem eles o caminho seria mais difícil.

À Deus pela força para seguir em frente mesmo diante das dificuldades.

Ao meu orientador, Gustavo Henrique Ribeiro da Silva, pela oportunidade de realização deste trabalho, pelas sugestões e pela disponibilidade sempre que precisei.

À minha coorientadora, Ana Paula Erbetta Sueitt, pelas sugestões, pela ajuda na resolução dos problemas, pela disponibilidade e pela amizade.

Ao professor Clóvis Wesley de Souza pelas sugestões, por me ensinar tanto e por disponibilizar o seu laboratório. Também pela alegria e bom humor que contagiava a todos e pela amizade.

Ao Matheus Darone Fronteira por toda ajuda com a parte microbiológica e pelo suporte quando o tempo era curto para a quantidade de trabalho requerida.

À técnica Maria Teresa Hoffmann pela ajuda com as metodologias e análises de laboratório.

Ao Alcino pela ajuda na parte técnica e pela preocupação em verificar sempre se tudo estava funcionando como deveria.

À professora Ana Teresa Lombardi pelas sugestões.

Ao professor Luiz Antônio Daniel pela disponibilidade de uso do LATAR para a realização deste trabalho.

À professora de graduação, Jandira Liria Biscalquini Talamoni, por me incentivar e me auxiliar a buscar a este mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida e à FAPESP pelos recursos concedidos através do processo FAPESP 2013/50351-4.

À UNESP por fazer parte da minha formação desde a graduação até o mestrado.

Aos amigos de coleta e do LATAR Hiago, Luan, Gabriela, Priscila e Camila pela companhia. Em especial à Nathalie por ter me ensinado as metodologias, por estar sempre disponível para ajudar, pela companhia dentro do laboratório, pela amizade e pelo suporte quando precisei.

À Larissa pelas sugestões, pela companhia na fase de escrita e pela amizade.

À Buzi e à Mayara por me fazerem sentir em casa em uma cidade nova e pela amizade.

Ao Guilherme pela companhia nos finais de semana e pela compreensão quando o cansaço, o estresse e a ansiedade eram maiores que eu.

Por último, agradeço pelos aprendizados adquiridos durante este mestrado.

## Resumo

A recuperação de nutrientes de água negra por meio do crescimento de microalgas é vista como uma solução promissora para o tratamento terciário de águas negras tratadas anaerobicamente, concomitante à recuperação de nutrientes incorporados na biomassa algal para uso como fertilizantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um consórcio de microalgas nativas e um isolado deste consórcio em comparação à *C. sorokiniana* no tratamento e recuperação de nutrientes de uma água negra tratada por um reator UASB utilizando cultivo aerado com e sem CO<sub>2</sub>. Na primeira etapa, a água negra tratada anaerobicamente foi colocada em ambiente controlado de luz e temperatura para permitir o crescimento das microalgas existentes. Na segunda e na terceira etapas foi utilizada água negra tratada anaerobicamente em fotobiorreatores em escala laboratorial de dois litros para o crescimento das microalgas durante bateladas de 7 dias. Na segunda etapa foram realizadas três bateladas com o consórcio de microalgas, com iluminação de 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  e cultivo sem e com CO<sub>2</sub>. Na terceira etapa foram realizadas duas bateladas sem CO<sub>2</sub> e duas bateladas com CO<sub>2</sub>, compostas por fotobiorreatores inoculados com o Consórcio, com o Isolado e com a *C. sorokiniana*, em triplicata, com iluminação de 120 a 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nos resultados da Etapa II o cultivo sem CO<sub>2</sub> apresentou melhores resultados de peso seco (0,32 g.L<sup>-1</sup>), de remoção de fósforo inorgânico (84%) e de nitrogênio amoniacal (49%) e resultados semelhantes de densidade óptica e contagem de células entre os cultivos sem e com CO<sub>2</sub>. Nos resultados da Etapa III, as bateladas com CO<sub>2</sub> apresentaram maior densidade óptica (2,37 a 2,87 nm) e taxa de crescimento (0,34 a 0,61d<sup>-1</sup>) em relação às bateladas sem CO<sub>2</sub>, mas estas apresentaram maiores remoções de nitrogênio amoniacal (80 a 88%) e fósforo inorgânico (64 a 82%). Estes resultados mostram que é possível o crescimento das microalgas em cultivos sem enriquecimento de CO<sub>2</sub> com remoção de nutrientes, diminuindo os custos de cultivo. Em relação às diferentes microalgas utilizadas não houve diferença significativa quanto à remoção de nutrientes. Nas análises de crescimento o Consórcio e o Isolado apresentaram resultados semelhantes. No entanto, estes (Consórcio e Isolado) apresentaram melhores resultados de crescimento em relação à *C. sorokiniana*, indicando que o uso de microalgas obtidas a partir do efluente no qual serão cultivadas é uma alternativa melhor em relação à obtenção de microalgas em bancos de algas. Assim, o cultivo de microalgas em água negra tratada anaerobicamente mostrou-se

viável, sendo que a escolha entre o cultivo com ou sem CO<sub>2</sub> dependerá de qual o objetivo final deste cultivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** água negra; microalgas; recuperação de nutrientes; saneamento ecológico.

## Abstract

The recovery of black water nutrients through the growth of microalgae has been seen as a promising solution for the tertiary treatment of anaerobically treated black waters, concomitant with the recovery of nutrients incorporated in the algal biomass for use as fertilizers. The objective of this work was to evaluate the efficiency of a consortium of native microalgae and an isolate of this consortium in comparison to *C. sorokiniana* in the treatment and nutrient recovery of a black water treated by a UASB reactor cultivated with aeration with and without CO<sub>2</sub>. In the first stage, the black water treated anaerobically was placed in controlled environment of light and temperature to allow the growth of the existing microalgae. In the second and third stages, anaerobically treated black water was used in two-liter laboratory scale photobioreactors for the growth of microalgae during 7-day batches. In the second stage three batchings were carried out with the microalgae consortium, with illumination of 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and without and with CO<sub>2</sub>. In the third stage two batch CO<sub>2</sub>-free and two CO<sub>2</sub> batch were performed, using photobioreactors inoculated with the Consortium, Isolate and *C. sorokiniana*, in triplicate, with illumination of 120 a 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . In the results of Step II, the crop without CO<sub>2</sub> had better dry weight (0.32 g.L<sup>-1</sup>), removal of inorganic phosphorus (84%) and ammoniacal nitrogen (49%) and similar results of optical density and cells between cultures without and with CO<sub>2</sub>. In the results of Stage III, CO<sub>2</sub> batch showed higher optical density (2.37 to 2.87 nm) and growth rate (0.34 to 0.61d<sup>-1</sup>) in relation to the batch without CO<sub>2</sub>, but these showed higher removals of ammoniacal nitrogen (80 to 88%) and inorganic phosphorus (64 to 82%). These results show that it is possible to grow microalgae in cultures without CO<sub>2</sub> enrichment with nutrient removal, reducing cultivation costs. In relation to the different microalgae used there was no significant difference regarding nutrient removal. In the growth analyzes, the

Consortium and Isolate presented similar results. However, these (Consortium and Isolate) presented better growth results in relation to *C. sorokiniana*, indicating that the use of microalgae obtained from the effluent in which they will be cultivated is a better alternative in relation to obtaining microalgae in algal banks . Thus, the cultivation of microalgae in anaerobically treated black water was feasible, and the choice between the cultivation with or without CO<sub>2</sub> will depend on the final objective of the culture.

**KEY-WORDS:** blackwater; microalgae; nutrient recovery; ecological sanitation.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Reservatório de efluente suíno na Granja Santo Ignácio de Loyola, Brotas - SP.....	23
<b>Figura 2</b> – Reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) em escala piloto instalado na ETE Monjolinho, São Carlos-SP, sendo os pontos de 1 a 5 diferentes alturas de coleta de lodo. ....	23
<b>Figura 3</b> – Caixa de mistura do efluente sanitário com o efluente suíno. ....	23
<b>Figura 4</b> – Fluxograma indicando as três etapas do trabalho. ....	24
<b>Figura 5</b> – Local de cultivo das microalgas utilizado nos experimentos localizado no LATAR com os rotômetros para controle da aeração e iluminação artificial. ....	28
<b>Figura 6</b> – Sistema de aeração da sala de cultivo localizada no LATAR utilizado nos experimentos.....	28
<b>Figura 7</b> – Garrafa de vidro utilizada como fotobiorreator com aeração e coleta de amostras com tubos de vidro. ....	29
<b>Figura 8</b> – Representação esquemática da terceira etapa do experimento. ....	31
<b>Figura 9</b> – Consórcio de microalgas isoladas da água negra tratada anaerobicamente vistas no microscópio óptico em (aumento de 100x). ....	35
<b>Figura 10</b> – Isolado 1 (esquerda) e Isolado 2 (direita) em meio BG-11.....	36
<b>Figura 11</b> - pH das Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo. ....	38
<b>Figura 12</b> – Peso seco das Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo. ....	40
<b>Figura 13</b> – Densidade óptica (682 nm) nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.....	41
<b>Figura 14</b> – Número de células por mililitro nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo. ....	43

<b>Figura 15</b> - Fósforo inorgânico e nitrogênio amoniacal nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo. ....	45
<b>Figura 16</b> – Temperatura de hora em hora durante o quinto dia de cultivo na Batelada 1 e durante o segundo dia de cultivo da Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> durante a Etapa III.....	49
<b>Figura 17</b> – Valores de pH da Batelada 1 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo. ....	50
<b>Figura 18</b> - Valores de pH da Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo. ....	50
<b>Figura 19</b> – Alcalinidade total inicial e final da Batelada 1 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	51
<b>Figura 20</b> – Alcalinidade total inicial e final da Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	52
<b>Figura 21</b> – Peso seco inicial e final da Batelada 1 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	53
<b>Figura 22</b> – Peso seco inicial e final da Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	53
<b>Figura 23</b> - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 1 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III.....	54
<b>Figura 24</b> - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III.....	54
<b>Figura 25</b> - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 1 da Etapa III sem CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.....	55
<b>Figura 26</b> - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 2 da Etapa III sem CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.....	55
<b>Figura 27</b> - Número de células por mililitro na Batelada 1 da Etapa III sem CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	56
<b>Figura 28</b> - Número de células por mililitro na Batelada 2 da Etapa III sem CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	56

<b>Figura 29</b> – Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 1 sem CO <sub>2</sub> da etapa III. ....	59
<b>Figura 30</b> - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 2 sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	60
<b>Figura 31</b> - Temperatura de hora em hora durante o segundo dia de cultivo na Batelada 1 e durante o quarto dia de cultivo da Batelada 2 com CO <sub>2</sub> durante a Etapa III. ....	61
<b>Figura 32</b> - pH da Batelada 1 com CO <sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo. ....	62
<b>Figura 33</b> - pH da Batelada 2 com CO <sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo. ....	62
<b>Figura 34</b> - Alcalinidade total inicial e final da Batelada 1 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	63
<b>Figura 35</b> - Alcalinidade total inicial e final da Batelada 2 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	63
<b>Figura 36</b> - Peso seco inicial e final da Batelada 1 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	64
<b>Figura 37</b> - Peso seco inicial e final da Batelada 2 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	64
<b>Figura 38</b> - Concentração de clorofila até o sexto dia de cultivo da Batelada 1 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	65
<b>Figura 39</b> - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 2 com CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	66
<b>Figura 40</b> - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 1 da Etapa III com CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	67
<b>Figura 41</b> - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 2 da Etapa III com CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	67
<b>Figura 42</b> - Número de células por mililitro na Batelada 1 da Etapa III com CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	68
<b>Figura 43</b> - Número de células por mililitro na Batelada 2 da Etapa III com CO <sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo. ....	68

**Figura 44** - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 1 com CO<sub>2</sub> da Etapa III..... 70

**Figura 45** - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 2 com CO<sub>2</sub> da Etapa III..... 71

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Características do afluente (água negra simulada) e do efluente (água negra anaerobicamente tratada) do reator UASB no período de Abril/2017 a Maio/2018. ....	22
<b>Tabela 2</b> – Temperaturas máxima, mínima, média e desvio padrão nas Bateladas 1, 2 e 3 durante a Etapa II. ....	37
<b>Tabela 3</b> – Temperaturas máxima, mínima e média nas bateladas 1 e 2 sem CO <sub>2</sub> durante a Etapa III. ....	49
<b>Tabela 4</b> - Temperaturas máxima, mínima e média nas bateladas 1 e 2 com CO <sub>2</sub> durante a etapa III. ....	61
<b>Tabela 5</b> – Resumo dos resultados do último dia de cultivo das bateladas com e sem CO <sub>2</sub> da Etapa III. ....	74

### **Lista de Siglas**

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMP - Departamento de Morfologia e Patologia

EcoSan - *Ecological Sanitation*

EESC - Escola de Engenharia de São Carlos

LATAR - Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas

NIOO - *Netherlands Institute of Ecology*

UASB – *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*

UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

USP – Universidade de São Paulo

**Lista de Abreviaturas**

$\mu\text{mol}$  – micromol

ADP – adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

cél – células

cm – centímetros

$\text{CO}_2$  – gás carbônico

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FBR – Fotobiorreator

g - gramas

L – litro

$\text{m}^2$  – metros quadrados

$\text{m}^3$  – metros cúbicos

mg – miligramas

min. – minuto

mL – mililitro

$\text{N}_2$  - nitrogênio gasoso

$\text{NH}_3$  – amônia

$\text{NH}_4^+$  - íon amônio

nm – nanômetros

$\text{NO}_2^-$  - nitrito

$\text{NO}_3^-$  - nitrato

$^\circ\text{C}$  – graus Célsius

pH – potencial hidrogeniônico

SST – sólidos suspensos totais

vvm – volume por volume por minuto

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. SANEAMENTO.....	6
3.1.1. SANEAMENTO ECOLÓGICO .....	6
3.1.2. ÁGUA NEGRA.....	7
3.1.3. REATOR ANAERÓBIO DE FLUXO ASCENDENTE (UASB) .....	9
3.2. FÓSFORO E NITROGÊNIO: ORIGEM, PROBLEMAS E SOLUÇÕES .....	10
3.3. MICROALGAS.....	14
3.3.1. NUTRIÇÃO .....	14
3.2.3. CULTIVO.....	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE.....	21
4.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	24
4.2.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS .....	25
4.2.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE .....	27
4.2.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE .....	30

4.3. ANÁLISES PARA QUANTIFICAÇÃO DAS MICROALGAS .....	31
4.3.1. PESO SECO .....	31
4.3.2. CLOROFILA <i>a</i> .....	32
4.3.3. DENSIDADE ÓPTICA .....	33
4.3.4. CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS .....	33
4.3.4. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO ( $d^{-1}$ ) .....	33
4.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	34
4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
5.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS .....	35
5.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE .....	36
5.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE.....	48
5.3.1. BATELADAS DE CULTIVO SEM CO <sub>2</sub> .....	49
5.3.2. BATELADAS DE CULTIVO COM CO <sub>2</sub> .....	61
5.3.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DIFERENÇAS OBSERVADAS ENTRE OS CULTIVOS SEM CO <sub>2</sub> E COM CO <sub>2</sub> .....	72
6. CONCLUSÕES .....	86
6.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS .....	86
6.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE .....	86

6.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE.....	86
7. RECOMENDAÇÕES.....	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89

## 1. INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento da população mundial e o sistema atual de produção e consumo excessivos, a preocupação com a escassez dos recursos naturais é cada vez maior. Segundo dados da World Wide Found for Nature (2016), desde os anos 1970 a humanidade consome mais recursos do que o planeta pode repor e o consumo mundial no ano de 2012 precisaria de 1,6 planetas Terra para ser sustentado, sendo que, com as projeções de aumento populacional e crescimento econômico, em 2020 a capacidade regenerativa da natureza será excedida em 75%. Junto ao consumo, a poluição do meio ambiente também é responsável por alterações nas reservas de recursos naturais como, por exemplo, a água. Assim, alternativas como o reuso e a reciclagem de recursos naturais são necessárias para a manutenção do planeta.

A agricultura no século XXI é baseada no uso de fertilizantes compostos de nitrogênio e fósforo, sem o uso destes seria necessária uma expansão de 167% no espaço destinado ao cultivo agrícola para atender a população mundial (DAWSON; HILTON, 2011). O nitrogênio, abundante na atmosfera, é fixado industrialmente na forma de amônia pelo processo Haber-Bosch, o qual consome 5% de todo o gás natural produzido no mundo, sendo insustentável a longo prazo. Já o fósforo é extraído da rocha fosfática, constituindo-se de um recurso não renovável. Somado a isto, o aumento antrópico de nitrogênio e fósforo no meio ambiente altera o ciclo natural destes nutrientes (GARCIA; CARDOSO; SANTOS, 2013).

Ao mesmo tempo, esgotos contêm altas concentrações de nitrogênio e fósforo e se despejados sem tratamento adequado em corpos d'água podem levar a um crescimento excessivo de plantas e algas e causar a eutrofização destes ecossistemas, prejudicando a vida aquática e tornando a água imprópria para os vários usos humanos, como o consumo (PANTANO et al., 2016).

O tratamento convencional de esgotos em sistemas centralizados considera o esgoto produzido nas áreas urbanas como um resíduo que deve ser afastado das residências em um fluxo linear. Como uma alternativa sustentável a este sistema convencional, surgiu na década de 1990 o saneamento ecológico, o qual enxerga o esgoto como uma fonte de recursos renováveis, transformando o tratamento dos resíduos em um ciclo fechado de consumo, geração de esgoto, tratamento e recuperação de nutrientes e água, os quais retornam ao ciclo por meio da agricultura (ESREY, 1998).

Neste sistema, o esgoto doméstico é dividido na origem em dois tipos de efluentes para facilitar a recuperação de água e nutrientes: água cinza e água negra. A água cinza é composta por água da cozinha, do chuveiro e da lavanderia, esta contém menor carga orgânica e menos patógenos em comparação a água negra, por isso, o seu reuso é facilitado devido ao tratamento simples necessário para atingir padrão de reuso. Já a água negra, composta por efluente de vaso sanitário, é vista como uma fonte de reaproveitamento de nutrientes devido à sua alta carga orgânica, porém contém a maior concentração de patógenos do esgoto doméstico (ESREY et al., 1998; KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006).

O tratamento anaeróbio da água negra é considerado a principal tecnologia que permite a recuperação de recursos, permitindo a produção de energia pela queima do metano liberado das reações bioquímicas e mantendo os nutrientes em seu efluente permitindo a recuperação destes por meio de um pós-tratamento (GRAAF, 2010). Considerando as necessidades de áreas rurais ou com poucos recursos, estes sistemas de tratamento devem ser simples e com pouca exigência de manutenção. O Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Blanket – UASB) atende a estes requisitos, permitindo a separação da fase sólida, líquida e gasosa (KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006).

Entre os pós-tratamentos mais utilizados para remoção de nutrientes do efluente estão o biológico por meio da desnitrificação e o químico, com adição de coagulantes ou alcalinizantes (VON SPERLING, 2007). Contudo, esses métodos possuem custo operacional elevado, podem gerar subprodutos no efluente e não permitem a recuperação destes nutrientes. Uma alternativa biológica com a possibilidade de recuperação dos nutrientes presentes no esgoto são as microalgas, reconhecidas por sua capacidade de tratar águas residuárias desde 1950 (NURDOGAN, 1995).

As microalgas são microrganismos capazes de transformar luz e gás carbônico na presença de nutrientes em proteínas, lipídios e carboidratos. O uso de microalgas para o tratamento de águas residuárias foi primeiramente reportado em 1957 por Oswald e Gotaas em lagoas. Entre as vantagens de associar o crescimento de microalgas com o tratamento de efluentes estão (1) capacidade de crescer em diversos efluentes; (2) consumo de gás carbônico; (3) absorção de nitrogênio e fósforo do efluente; (4) geração de produtos de valor como lipídios, proteínas e fertilizantes (HWANG, 2016).

No entanto, o cultivo de microalgas em efluentes apresenta alguns desafios, entre eles, a escolha da melhor espécie ou consórcio destes microrganismos, pois cada espécie possui especificidades em relação às melhores condições de crescimento. Estudos reportam que o uso de uma espécie nativa do efluente possui melhores resultados de crescimento e remoção de nutrientes em relação a outras microalgas devido à melhor adaptação aos compostos e microrganismos presentes (ZHOU et al., 2017).

Além disso, diferentes variáveis podem alterar a eficiência do processo como, por exemplo, a luminosidade, o pH, a presença de outros microrganismos, a temperatura, a aeração e os constituintes da água residuária, existindo a necessidade de mais estudos para melhorar as condições de cultivo. Assim, neste trabalho avaliamos a

capacidade de crescimento e remoção de nutrientes de diferentes microalgas em água negra tratada anaerobicamente em cultivos aerados com e sem CO<sub>2</sub>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o crescimento de microalgas em água negra tratada anaerobicamente por Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente, comparar os regimes de cultivo com e sem CO<sub>2</sub> e determinar a remoção de nitrogênio e fósforo em cada sistema de cultivo.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um consórcio de microalgas a partir de água negra tratada anaerobicamente.
- Isolar microalgas predominantes no consórcio obtido a partir de água negra tratada anaerobicamente.
- Comparar o crescimento e a remoção de nitrogênio e fósforo das diferentes microalgas.
- Avaliar a influência da aeração com suplementação de CO<sub>2</sub> em relação à aeração somente com ar comprimido no que diz respeito ao crescimento e à remoção de nutrientes.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. SANEAMENTO

##### 3.1.1. SANEAMENTO ECOLÓGICO

Com o crescimento urbano, a poluição causada pelo despejo de esgotos sem tratamento polui os corpos d'água e aumenta o risco de doenças causadas por patógenos presentes no esgoto. No Brasil, segundo o Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos (2016) com dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, 51,9% dos municípios brasileiros possuem coleta de esgoto, deixando mais de 34 milhões de pessoas sem acesso a este serviço e apenas 44,9% do esgoto produzido passa por tratamento antes do despejo em corpos d'água.

Os sistemas de coleta e tratamento de esgotos convencionais são baseados no conceito de disposição final de resíduos, no qual os rejeitos são descartados num fluxo linear de consumo, geração de resíduos e descarte. Este sistema no início resolveu os problemas de saneamento nas cidades, mas em muitos casos o tratamento de esgoto não ocorre devido aos altos custos e dificuldades de implementar este sistema em países em desenvolvimento, subdesenvolvidos, em comunidades rurais e sem recursos (ESREY et al., 1995).

Assim, como uma alternativa ao saneamento convencional surgiu o chamado Saneamento Ecológico (*Ecological Sanitation – EcoSan*), baseado num fluxo circular de tratamento de esgoto, no qual a água, os nutrientes e a matéria orgânica presentes no esgoto são vistos como recursos a serem reutilizados e retornam para o sistema por meio da agricultura após os devidos tratamentos para remoção de patógenos (ESREY et al., 1995).

Desde o início da concepção do saneamento ecológico nos anos 1990, foram realizados estudos e projetos em diferentes países, tanto desenvolvidos como a

Alemanha (STEINMÜLLER, 2007), Suécia (WERNER et al., 2009) e Holanda (BIJLEVELD, 2003), como em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos como os do continente africano (SIMHA; GANESAPILLAI, 2017).

Von Münch e Ingle (2012) fizeram um estudo compilado de 25 casos de aplicação de saneamento ecológico com separação dos resíduos e reuso dos recursos em países da África com aplicações em áreas rurais, escolas e pequenas comunidades. Por exemplo, na cidade de Béni Abbès, na Argélia, foi montado um projeto piloto de separação de água cinza em duas residências, dois prédios públicos e um hotel, o sistema contava com uma sequência de filtros com capacidade para tratar  $150 \text{ L.dia}^{-1}$  e ao final permitia o reuso da água para irrigação de jardins e hortas, evitando o uso de água potável para estes fins, escassa na região.

Exemplos como este demonstram o potencial de sistemas descentralizados de tratamento de esgoto em regiões com poucos recursos que podem fazer o reuso local da água e nutrientes recuperados do esgoto, melhorando o saneamento e fornecendo recursos escassos nestes locais.

### 3.1.2. ÁGUA NEGRA

A água negra é composta por urina, fezes e água utilizada para a descarga, com a separação da água cinza e da água de chuva. Possui uma alta concentração de matéria orgânica e nutrientes quando comparada com o esgoto doméstico. A água negra contém 38% do carbono em forma de Demanda Química de Oxigênio existente em esgoto doméstico, 68% do fósforo e 82% do nitrogênio, permitindo a recuperação de 80% a 95% dos nutrientes quando coletada separadamente (ESREY et al., 1998; KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006).

O nitrogênio na água negra, assim como em esgoto doméstico, está presente nas formas de ureia, proteína e aminoácidos, os quais no primeiro estágio de decomposição

são transformados em amônia. A amônia em solução aquosa pode apresentar-se na forma livre ( $\text{NH}_3$ ), que é tóxica em baixas concentrações para os seres vivos ou na forma ionizada chamada de íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), dependendo do valor do pH. Em valores de pH menores que 8,0, quase toda a amônia encontra-se na forma ionizada, em pH 9,5 a composição é de 50%  $\text{NH}_3$  e 50%  $\text{NH}_4^+$  e em valores de pH acima de 11 a amônia é encontrada na forma livre (KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006; VON SPERLING, 2007).

O fósforo na água negra pode estar presente na sua forma orgânica ou inorgânica, sendo a maior parte inorgânica. Na urina, 95% do fósforo está presente na forma de ortofosfatos e nas fezes o fósforo é encontrado como fosfato de cálcio não digerido (VON SPERLING, 2007; KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006).

Apesar de ser uma fonte de nutrientes, a água negra contém uma alta concentração de patógenos, como bactérias, protozoários e vírus. E também micropoluentes como hormônios naturais e artificiais liberados pela urina, fármacos e metais pesados, os quais precisam ser removidos por tratamentos específicos (GRAAF, 2010; BUTKOVSKYI, 2016).

O tratamento da água negra precisa ser planejado de forma a permitir a remoção de matéria orgânica com um tratamento secundário, a recuperação dos nutrientes com um tratamento terciário e a adequação às necessidades do local que será implantado e ao tipo de reuso que será dado. Este tratamento é pensado inicialmente para sistemas descentralizados de tratamento de esgoto, em zonas rurais e regiões sem recursos que podem aproveitar o reuso local dos nutrientes e da água, para isso o sistema deve ser simples e com baixo custo (KUJAWA-ROELEVELD; ZEEMAN, 2006).

Entre as opções de tratamento secundário para efluentes altamente concentrados como a água negra, o tratamento anaeróbio se destaca como uma alternativa sustentável

com baixos custos de construção e operação, baixa produção de lodo e baixo consumo de energia. Além disso, permite a produção de energia e calor por meio da queima do metano liberado das reações bioquímicas e os nutrientes são mantidos em seu efluente permitindo a recuperação destes por meio de um pós-tratamento (CHERNICHARO, 2007; GRAAF, 2010).

### 3.1.3. REATOR ANAERÓBIO DE FLUXO ASCENDENTE (UASB)

O reator anaeróbio de fluxo ascendente possui uma manta de lodo composta por microrganismos anaeróbios que oxidam a matéria orgânica liberando metano e gás carbônico. O afluente entra no reator pela parte inferior, entra em contato com a manta de lodo e o efluente sai do reator pela parte superior. O tempo de detenção hidráulica é determinado pelo dimensionamento do reator e pelas características do afluente (CHERNICHARO, 2007).

A temperatura possui papel fundamental no metabolismo dos microrganismos da manta de lodo, sendo temperaturas altas (entre 20 e 40 °C) ideais, por isso esses reatores tiveram grande aplicação em países tropicais como o Brasil. Segundo dados da Agência Nacional de Águas, dos 2.187 sistemas de tratamento de esgoto centralizados analisados no Brasil, que correspondem a 51.878.930 de habitantes, 95% são compostos apenas por reatores UASB ou seguidos por algum sistema de pós-tratamento (VON SPERLING, 2016).

No tratamento de águas negras o uso do UASB tem sido reportado com resultados satisfatórios. Graaf (2010) realizou um estudo no qual água negra proveniente de vasos sanitários com descarga a vácuo (sem uso de água) na Holanda, com DQO de 9.800 mg.L<sup>-1</sup>, era tratada por meio de um reator UASB de 50 L de volume e tempo de detenção hidráulica média de 8,7 dias, obtendo remoção média de 74% da DQO.

Abdel-Shafy et al. (2009) utilizaram um reator UASB em escala piloto de 0,25 m<sup>3</sup> de volume para tratar água negra com uma DQO de 1160 mg.L<sup>-1</sup>, 558 mg.L<sup>-1</sup> de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e 362 mg.L<sup>-1</sup> de Sólidos Suspensos Totais com detenção hidráulica de 24 horas. A remoção de DQO foi de 65,1%, de DBO de 67,5% e de SST de 74,4%, demonstrando a eficiência deste reator em sistemas descentralizados para o tratamento de água negra.

### 3.2. FÓSFORO E NITROGÊNIO: ORIGEM, PROBLEMAS E SOLUÇÕES

Desde a antiguidade, a humanidade utilizava-se de esterco e fezes humanas para melhorar as plantações. Em 1840 com a descoberta de que os minerais como nitrogênio e fósforo passavam da matéria orgânica em decomposição para as plantas, surgiu uma indústria para transformar restos de produtos orgânicos em fertilizantes. Então, nos séculos XIX e XX, outras fontes de nutrientes foram descobertas, sendo elas o guano e as rochas fosfáticas para o fósforo e o processo Haber Bosch para fixação industrial de nitrogênio atmosférico (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009; DAWSON; HILTON, 2011).

O fósforo é um elemento essencial para os seres vivos, nestes está presente na estrutura das moléculas de DNA e de RNA, faz parte da composição do ATP, nucleotídeo responsável pelo transporte de energia na célula e compõe a membrana celular na forma de fosfolipídio. Na natureza é encontrado em rochas fosfáticas como as apatitas e é transportado para os solos e águas por meio da erosão natural, no entanto a intervenção humana com a retirada excessiva deste mineral tem causado desequilíbrios no seu ciclo biogeoquímico (PANTANO et al., 2016).

O ciclo biogeoquímico do fósforo é considerado um ciclo fechado, pois acontece somente na biosfera onde é disponibilizado no solo para as plantas que o absorvem entrando na cadeia alimentar e seu retorno ao solo é feito pela decomposição de plantas

e animais. Nos ambientes aquáticos, o fósforo é disponibilizado pela dissolução das rochas fosfáticas e está presente na forma de fosfato apresentando importante papel na produtividade primária destes ambientes (ESTEVEZ, 1998).

Hoje, 90% da demanda de rocha fosfática mundial é para a produção de alimentos e com o crescimento populacional em 2050 é previsto que duplique a demanda. As reservas de fósforo são finitas, o que leva a um problema de escassez diretamente ligada à chamada *food security*, termo usado pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) que representa o “acesso de todas as pessoas a comida segura e nutricional que vá de encontro as suas necessidades dietéticas para uma vida ativa e saudável” (CORDELL; DRANGERT; WHITE, 2009).

Nos seres vivos, o nitrogênio é essencial para a formação de aminoácidos e dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo um dos nutrientes limitantes no crescimento de plantas. O ciclo biogeoquímico do nitrogênio é considerado um ciclo aberto, pois acontece na atmosfera e na biosfera, existindo em maior quantidade na sua forma gasosa ( $N_2$ ), que compõe 78% da atmosfera terrestre. Para que seja utilizado pelas plantas na biosfera, o nitrogênio precisa estar disponível em formas inorgânicas como o íon amônio ( $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) e nitrato ( $NO_3^-$ ) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico em nitrogênio inorgânico é realizada somente por alguns seres vivos, sendo as bactérias em simbiose com raízes de plantas leguminosas, como as espécies do gênero *Rhizobium*, as principais responsáveis por este processo. Após a utilização das formas inorgânicas pelas plantas, o nitrogênio é assimilado pelos outros seres vivos por meio da cadeia alimentar. Ao final, retorna para os ecossistemas pela decomposição da matéria orgânica e é disponibilizado novamente nas formas inorgânicas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

No final do século XIX e início do século XX, a demanda de nitrogênio para a agricultura aumentou a pressão para o surgimento de uma tecnologia efetiva que produzisse nitrogênio de forma industrial. Então, em 1909 surgiu o processo Haber Bosch para fixação do nitrogênio atmosférico em amônia ( $\text{NH}_3$ ), o qual estabeleceu a indústria de produção de fertilizantes. Hoje 50% do alimento produzido no mundo dependem de fertilizantes a base de amônia. Este processo, no entanto, é responsável por 2,5% do consumo de combustíveis fósseis no mundo e libera de 4 - 8 toneladas de  $\text{CO}_2$  por tonelada de nitrogênio fixado, tornando-se insustentável a longo prazo (DAWSON; HILTON, 2011; BRIGHTLING, 2018).

O consumo excessivo de fertilizantes à base de fósforo e nitrogênio tem alterado o ciclo destes elementos de forma significativa devido ao escoamento superficial que leva ao carreamento do excesso destes fertilizantes do solo e ao despejo de águas residuárias, as quais contêm altas concentrações de fósforo e de nitrogênio quando não tratadas. Estes nutrientes são os principais responsáveis pela eutrofização de ambientes aquáticos continentais. (PANTANO et al., 2016).

A eutrofização é um processo que pode ocorrer em corpos d'água como lagos, lagoas e represas nos quais ocorre um crescimento exagerado de algas e plantas aquáticas devido às altas concentrações de nutrientes. Este crescimento cria condições anaeróbias no corpo d'água, tanto pela ausência de luz e fotossíntese, como pela reprodução de bactérias heterotróficas, levando a morte de diversos organismos dependentes de oxigênio. Assim, altera todo o ecossistema e torna a água imprópria para vários usos humanos (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996).

O tratamento secundário de efluentes não remove os nutrientes, sendo necessário passar por uma etapa complementar: tratamento terciário. Existem tratamentos físico-químicos ou biológicos para remoção de nutrientes. O nitrogênio pode ser removido

pela volatilização da amônia com a adição de alcalinizantes para elevação do pH ou por processo biológico com a nitrificação realizada por bactérias nitrificantes presentes no efluente, este precisa de oxigênio para ocorrer e de um processo de desnitrificação em seguida para transformação do nitrato em nitrogênio gasoso. No entanto, os dois métodos tornam o tratamento caro e não recuperam o nitrogênio para outros usos (VAN HAANDEL; KATO; VON SPERLING, 2009).

A remoção química de fósforo pode ser feita por meio da precipitação com metais, formando fosfatos pouco solúveis como fosfato de cálcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , apatita  $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$  ou estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ ), este processo, além dos altos custos com produtos químicos, produz um lodo químico de difícil descarte. O tratamento biológico para remoção de fósforo ocorre pela incorporação deste no lodo por meio do metabolismo de algumas bactérias, o que permite o reuso deste lodo como fonte de fósforo, porém o processo de incorporação no lodo é complexo, sendo necessárias zonas aeróbias e anóxicas no sistema (VAN HAANDEL et al., 2009).

Para remoção efetiva de nitrogênio e fósforo do efluente ao mesmo tempo em que incorpora estes nutrientes em uma biomassa possível de ser utilizada como fertilizantes, as microalgas apresentam-se como uma solução viável. Estas existem naturalmente em esgoto sanitário e são capazes de se adaptar em diferentes tipos de efluentes (KOUTRA et al., 2018). Após o seu crescimento, as microalgas são separadas do efluente, podendo reaproveitar a biomassa rica em nutrientes. Mulbry et al. (2005) fizeram um estudo para avaliar o valor da biomassa de microalgas como fertilizantes. As microalgas cresceram em um efluente de fezes de gado digerido anaerobicamente e foram utilizadas para fertilizar pepino e milho em comparação a um fertilizante industrial, alcançando resultados satisfatórios, concluíram que a biomassa algal poderia substituir o fertilizante.

### 3.3. MICROALGAS

#### 3.3.1. NUTRIÇÃO

As microalgas são microrganismos unicelulares fotossintetizantes presentes principalmente em ambientes aquáticos. Na cadeia trófica destes ambientes desempenham o papel de produtores primários, formando o chamado fitoplâncton. Elas são capazes de absorver nutrientes e gás carbônico do ambiente, utilizando-os no seu metabolismo para produzir carbono orgânico e gás oxigênio (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1996; SINGH; DHAR, 2011).

As microalgas possuem um importante papel na conversão de nitrogênio inorgânico em nitrogênio orgânico, disponibilizando-o para a cadeia trófica. O consumo de nitrogênio é feito na forma inorgânica de nitrato, nitrito e íon amônio, sendo o amônio a forma preferida pelas microalgas pelo menor gasto de energia. Em seguida ocorre o consumo de nitrato, mas não até que a amônia esteja quase completamente consumida (CAI; PARK; LI, 2013). A tolerância de diferentes espécies de microalgas às concentrações de amônio vai até 1800 mg  $\text{NH}_4^+$ -N/L. Significativas quantidades podem ser volatilizadas do sistema em altas temperaturas e com o pH acima de 9,0. (CAI; PARK; LI, 2013).

O fósforo inorgânico é incorporado pelas microalgas nas formas de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  por meio da fosforilação que envolve a formação de moléculas de ATP por meio da adenosina difosfato (ADP) (CAI; PARK; LI, 2013).

As microalgas são compostas, em média, por 50% de carbono, variando entre espécies. O consumo de carbono pode ser feito por metabolismo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. Nos organismos fotossintéticos autotróficos o carbono é adquirido na forma inorgânica de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) pela fotossíntese, sendo este processo dependente de luz (KUMAR, et al., 2011). Nos ambientes aquáticos o  $\text{CO}_2$

está dissolvido na água e forma um sistema de equilíbrio dependente do pH, de acordo com a reação (1). Além do pH, a concentração de CO<sub>2</sub> depende da temperatura, da salinidade e dos sólidos dissolvidos totais (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).



As microalgas no geral vivem em pH entre 7,0 e 9,0, sendo a forma de carbono dominante nessa faixa de pH o bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), que pode ser transportado através da membrana celular e transformado em CO<sub>2</sub> pela enzima anidrase carbônica (CA) no meio intracelular. Algumas espécies excretam a CA para o meio extracelular para a conversão antes do transporte (MARKOU; VANDAME; MUYLAERT, 2014).

Microalgas heterotróficas obtêm o carbono na forma orgânica presente no meio em moléculas pequenas, preferencialmente glicose ou acetato. Microalgas mixotróficas apresentam tanto o metabolismo autotrófico, quanto o metabolismo heterotrófico. Cultivos mixotróficos podem utilizar uma espécie mixotrófica ou mais de uma espécie de microalga (RICHMOND; HU, 2013).

O ar atmosférico possui 0,03% de CO<sub>2</sub> na sua composição, mas para cultivos autotróficos e mixotróficos, esta concentração é baixa, sendo necessário o enriquecimento de gás carbônico. O uso de CO<sub>2</sub> industrial torna o processo caro e insustentável, no entanto, estudos tem demonstrado o potencial de mitigação de CO<sub>2</sub> presente em gás de combustão por meio de cultivos de microalgas, diminuindo o lançamento deste gás na atmosfera (JUDD et al., 2015). Por exemplo, Kao et al. (2014) usando gás de combustão de diferentes indústrias no enriquecimento do cultivo de

*Chlorella* sp. obtiveram  $2,85 \text{ g.L}^{-1}$  de peso seco com gás de forno de coque diluído em 1:2 com ar durante sete dias de cultivo em meio f/2.

Na utilização de carbono inorgânico na forma de  $\text{CO}_2$  nos cultivos, fatores como a luz, temperatura, fotoperíodo, concentração de células iniciais e o volume de  $\text{CO}_2$  inadequados podem ter efeito inibitório (KUMAR et al., 2011). Alguns estudos testaram diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$  para determinar qual a mais adequada dependendo da espécie de microalga e do efluente utilizado. Nayak et al. (2016) cultivando a microalga *Scenedesmus* sp. em esgoto doméstico por sete dias com aeração enriquecida com concentração de  $\text{CO}_2$  de 0,03 a 10% obtiveram maior crescimento com aeração a 2,5%.

No cultivo em esgotos, o uso de microalgas heterotróficas pode ser vantajoso, pois este contém concentrações de matéria orgânica que permitem o crescimento das microalgas e não necessita de enriquecimento com gás carbônico, tornando o processo mais simples e autossustentável. No entanto, não são todos os compostos orgânicos que as microalgas conseguem assimilar, moléculas associadas a partículas sólidas precisam ser quebradas em moléculas menores, para isso, o uso de um efluente tratado anaerobicamente mostra-se mais adequado (ZHOU et al., 2017).

### 3.2.3. CULTIVO

Os sistemas de cultivo de microalgas podem ser abertos ou fechados. As lagoas abertas são os sistemas abertos mais comuns e foi o primeiro sistema de cultivo de microalgas utilizado, tendo como vantagens o baixo custo de implantação e manutenção. Porém, a exposição às condições ambientais do local pode alterar vários parâmetros necessários ao bom funcionamento do sistema, como a temperatura, o pH e a luminosidade, diminuindo sua eficiência (CAI; PARK; LI, 2013).

Os sistemas fechados caracterizam-se por funcionarem em condições ambientais controladas, ao contrário das lagoas, estes possuem uma alta produtividade devido ao

controle dos parâmetros fundamentais de crescimento das microalgas. Apesar dos custos mais altos, estes sistemas possibilitam a produção de microalgas em larga escala (CAI; PARK; LI, 2013).

Para melhores resultados no crescimento das microalgas, os cultivos devem levar em conta a iluminação, esta pode ser natural ou artificial e os reatores devem ser projetados de forma a permitir a entrada de luz em todo o sistema. A luz natural torna o cultivo sustentável, sem gasto de energia, mas deve ser pensada de forma a não prejudicá-lo. Regiões tropicais possuem uma radiação solar muito alta que pode aumentar a temperatura do sistema e levar a morte das microalgas (ZHOU et al., 2017).

A aeração é outro fator importante nos cultivos em fotobiorreatores para promover a mistura do cultivo, evitando a sedimentação das microalgas, permitindo que todas as células recebam a mesma quantidade de luz. Além disso, a aeração pode ser utilizada para fornecer o gás carbônico necessário para as microalgas autotróficas, adicionando-se uma porcentagem em relação ao volume total de ar (KUMAR et al., 2010).

Com relação ao meio de cultivo, diversos efluentes já foram utilizados no crescimento de microalgas, como efluente de estação de tratamento de esgoto municipal (WANG et al., 2010; JI et al., 2013a; ZHAI et al., 2017), efluente de suinocultura (KUMAR; MIAO; WYATT, 2010; JI et al., 2013b), efluente agroindustrial (FRANCHINO et al., 2013) e urina pura (TUANTET et al., 2014). Em água negra foram reportados poucos estudos, mas demonstram alta eficiência de remoção de nitrogênio e fósforo. Fernandes et al. (2015) usaram água negra anaerobicamente tratada para o crescimento da *C. sorokiniana*. Os autores utilizaram um flat-panel de 380 ml com aeração enriquecida com 10% de CO<sub>2</sub> em batelada e após oito dias obtiveram 9,1

g.L<sup>-1</sup> de biomassa, 76,1% de remoção de nitrogênio amoniacal e 100% de remoção de fósforo inorgânico.

Segundo Olguín (2003), a seleção das espécies de microalgas adequadas ao ambiente no qual serão cultivadas torna mais eficiente o processo de remoção de nutrientes. A tolerância a variações ambientais como temperatura, pH e luminosidade é um fator importante na escolha da melhor microalga (OLGUÍN, 2012). No cultivo em efluentes concentrados como a água negra, também é necessária tolerância a altas concentrações de nutrientes (WU et al., 2014).

Diferentes microalgas foram testadas para o crescimento em diferentes tipos de efluentes, entre elas, as microalgas verdes (clorófitas) foram reportadas na literatura com melhor adaptação a estes ambientes, dentro deste filo, o gênero *Chlorella* destaca-se com bons resultados de crescimento e remoção de nutrientes (WU et al., 2014). Wang et al. (2010) utilizaram a *Chlorella* sp. para remoção de nutrientes em diferentes fases do tratamento de uma estação de tratamento de esgoto municipal. As microalgas tiveram boa adaptação a todos os efluentes das diferentes fases de tratamento. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos no efluente bruto, anterior a decantação primária, chegando a 82,4% de remoção de nitrogênio amoniacal e 83,2% de remoção de fósforo inorgânico. A *Chlorella vulgaris* também foi utilizada em diferentes estudos e mostrou-se eficiente na remoção de nutrientes (HE et al., 2013; KUMAR; MIAO; WYATT, 2010; LIU et al., 2017; ZNAD et al., 2018).

Dentro da necessidade de uma espécie com tolerância a variações ambientais como temperatura, pH e concentração de nutrientes, a *Chlorella sorokiniana* destaca-se por ser uma espécie resistente e possuir metabolismo mixotrófico, uma característica desejável no cultivo em efluentes com presença de carbono (MORITA; WATANABE; SAIKI, 2000; KIM; LEE; HWANG, 2013).

Fernandes et al. (2015) compararam o desempenho das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus elongates*, *Anabaena flos-aquae*, *Synechocystis* sp. e *Chlorella sorokiniana* cultivadas em água negra tratada anaerobicamente em frascos Erlenmeyer de 300 ml a 25 °C e aeração enriquecida com 3% de CO<sub>2</sub>. As microalgas com melhor crescimento foram a *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e a *Chlorella sorokiniana*, todas com aproximadamente 4 g.L<sup>-1</sup> de peso seco após 13 dias de cultivo, no entanto, em relação ao consumo de nutrientes a *C. sorokiniana* apresentou maior remoção.

Além da escolha de uma microalga externa, a busca por microalgas nativas no próprio efluente que será tratado é vista como uma alternativa, pois a adaptação pré-existente da espécie nativa ao efluente oferece vantagens e torna o seu cultivo mais eficiente (ZHOU et al., 2017). Bohutskyi et al. (2015) compararam a eficiência de remoção de nutrientes de efluente de tratamento primário e secundário de uma estação de tratamento de esgoto entre espécies de microalgas adquiridas de uma coleção de algas e de duas espécies isoladas do próprio efluente. Os melhores resultados foram encontrados nos cultivos com uma espécie de *Scenedesmus* e com os dois isolados.

Na escolha do inóculo para remoção de nutrientes também deve ser levado em consideração a existência de microrganismos no efluente, como bactérias e outras microalgas, assim a escolha de um consórcio de microrganismos, entre microalga-bactéria e microalga-microalga, pode trazer melhores resultados de crescimento e remoção de nutrientes, já que a interação e trocas de metabólitos entre eles oferece benefícios mútuos e vai ocorrer naturalmente assim que o sistema entrar em funcionamento (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Alguns trabalhos compararam a eficiência de tratamento de efluentes com consórcios de microalgas (RENUKA et al., 2013; QIN et al., 2016) e consórcios bactéria-microalgas (HE et al.,

2013; ALCANTARA et al., 2015; SU; MENNERICH; URBAN, 2011) em relação a microalgas sozinhas. No entanto, no tratamento de água negra tratada anaerobicamente foram utilizadas microalgas externas apenas, sendo que o potencial de uso de consórcios e microalgas nativas ainda necessita de elucidações.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho é parte integrante do projeto da FAPESP/NWO (Processo 2013/50351-4), intitulado *Recovering nutrients and carbon from concentrated black water: A sustainable decentralized approach for wastewater treatment*, realizado em conjunto pela Escola de Engenharia de São Carlos – USP, Faculdade de Engenharia de Bauru – UNESP e *Netherlands Institute of Ecology* – NIOO-KNAW, Wageningen.

##### 4.1. ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Por conta da ausência de separação de água cinza e água negra no sistema de esgoto na cidade de São Carlos-SP, onde a pesquisa foi realizada, a água negra a ser tratada foi simulada por meio de uma mistura contendo esgoto sanitário (proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, São Carlos – SP) e dejetos de uma granja de suínos (Fazenda Santo Ignácio de Loyola, Brotas – SP, Figura 1).

A água negra anaerobicamente tratada usada para o cultivo de microalgas neste trabalho corresponde ao efluente do reator anaeróbio de fluxo ascendente (UASB) em escala piloto instalado na ETE Monjolinho (Figura 2). O reator possuía volume útil de 640 litros e era operado com tempo de detenção hidráulica de três dias, sendo alimentado com água negra simulada como detalhado anteriormente.

A alimentação do reator UASB era realizada por uma bomba ligada a um tanque de 1.600 litros (Figura 3) no qual a mistura do efluente suíno com o esgoto sanitário era feita semanalmente. Nas Etapas I e II do trabalho (itens 4.2.1 e 4.2.2) a mistura continha 200 litros de dejetos suínos e 1.400 litros de esgoto sanitário. No decorrer da pesquisa, o volume de efluente suíno foi aumentado para elevar a concentração de saída de nutrientes do reator, passando para 350 litros misturados em 1.250 litros de esgoto sanitário na Etapa III (item 4.2.3).

As características do afluente (água negra simulada) e do efluente (água negra anaerobicamente tratada) do reator UASB estão listadas na Tabela 1. Os dados apresentados na tabela são provenientes de uma compilação de dados de monitoramento realizados pelo grupo de pesquisa composto por alunos de mestrado, doutorado e pós-doutorado no período de Abril de 2017 a Maio de 2018.

**Tabela 1** – Características do afluente (água negra simulada) e do efluente (água negra anaerobicamente tratada) do reator UASB no período de Abril/2017 a Maio/2018.

Parâmetros	Unidades	Afluente	Efluente	Remoção	Legislação*
pH	-	7,0 ±0,2	7,5 ±0,1	-	6,0-9,0
DQO <sub>total</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	4030,8 ±2279,3	551,9 ±309,0	86%	-
Alcalinidade Total	mg.L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	560,6 ±214,7	967,7 ±267,2	-	-
Nitrogênio Amoniacal	mg.L <sup>-1</sup>	184,1 ±69,2	202,1 ±62,8	-9%	13,3
Fósforo Inorgânico	mg.L <sup>-1</sup>	47,6 ±14,2	41,7 ±10,0	12%	0,15
Sólidos Totais	mg.L <sup>-1</sup>	3007,1 ±1927,6	1158,3 ±391,4	61%	-

Fonte: Dados das análises semanais de Abril de 2017 a Maio de 2018. \*CONAMA 357, 2005, Padrão de lançamento de efluente - Águas doces classe 3.

**Figura 1** – Reservatório de efluente suíno na Granja Santo Ignácio de Loyola, Brotas - SP.



Fonte: autora.

**Figura 2** – Reator anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) em escala piloto instalado na ETE Monjolinho, São Carlos-SP, sendo os pontos de 1 a 5 diferentes alturas de coleta de lodo.



Fonte: autora.

**Figura 3** – Caixa de mistura do efluente sanitário com o efluente suíno.

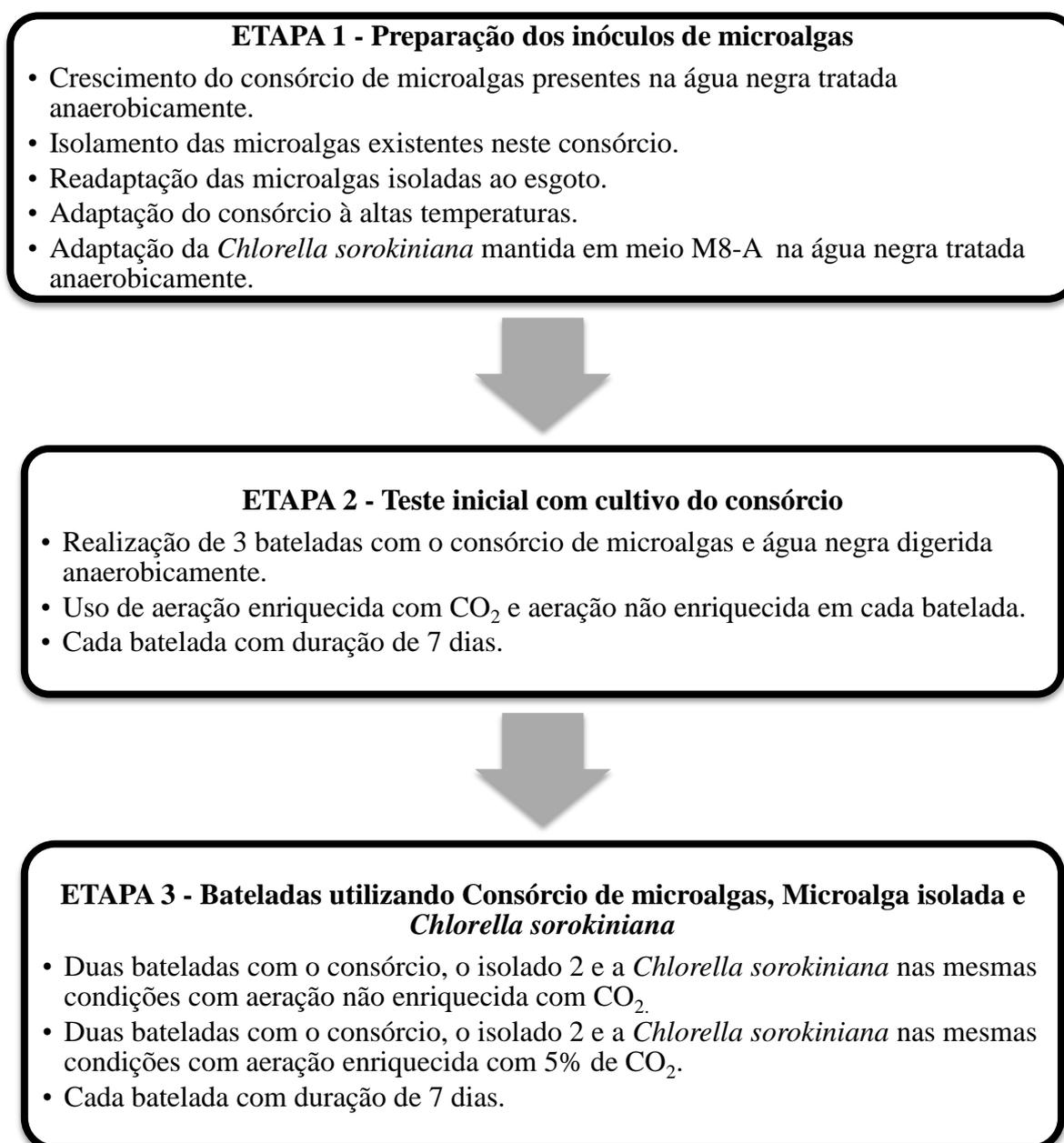


Fonte: Valdez, 2016.

#### 4.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi dividido em três etapas (Figura 4), sendo que a primeira foi conduzida no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) e as duas últimas etapas no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) na Universidade de São Paulo (USP).

**Figura 4** – Fluxograma indicando as três etapas do trabalho.



#### 4.2.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS

##### 4.2.1.1. Consórcio e Isolado

Um dos objetivos desta pesquisa foi usar uma cepa de microalga nativa da água negra tratada anaerobicamente. Para realizar o isolamento desta cepa, a água negra tratada foi coletada e mantida em Erlenmeyers de 500 ml em uma sala com temperatura de 25°C e iluminação com lâmpadas fluorescentes ( $100$  a  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) com fotoperíodo de 12/12 horas de forma a permitir que as espécies de microalgas presentes crescessem. Após 20 dias foi observado o crescimento de microalgas pela coloração verde do efluente, com confirmação por microscópio óptico no aumento de 40 vezes (Nikon® – Alphaphot 2 YS2).

Em seguida, um novo cultivo utilizando essas microalgas foi realizado mantido em temperaturas mais altas, com o objetivo de aclimatar as microalgas à temperatura de 34°C, que seria utilizada na segunda etapa do experimento. Para isso, foram utilizados Erlenmeyers de 250 ml, com volume de 100 ml de água negra tratada anaerobicamente recém-coletada e inoculada com um volume do consórcio de microalgas para que a concentração final fosse  $1 \times 10^5$  células. $\text{ml}^{-1}$ . Os sistemas de cultivo foram mantidos em uma incubadora de DBO (Solab SL – 224) com fotoperíodo de 12 horas, iluminação de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (medida de luz em PPF – *Photosynthetic Photon Flux Density*, ou seja, a quantidade de fótons que atinge uma determinada área por segundo) e a temperatura de incubação foi aumentada gradativamente de 2 em 2°C a cada três ou quatro dias, quando um novo repique com novo efluente era preparado. Desse modo, os cultivos começaram a ser incubados a 27°C e ao longo dos sucessivos repiques a temperatura final foi de 34°C.

O controle do crescimento foi feito por contagem de células usando um microscópio óptico (Nikon® – Alphaphot 2 YS2) e a Câmara de Contagem de Fuchs-

Rosenthal (KASVI®). A contagem era feita no dia do repique para que o novo cultivo tivesse uma concentração de  $1 \times 10^5$  células.ml<sup>-1</sup>.

Para isolamento da cepa predominante, foi realizada a diluição seriada até  $1 \times 10^5$  do efluente com crescimento de microalgas em meio LC Oligo (AFNOR, 1980) sólido com 1% de ágar por meio de técnica de estria de esgotamento. Após o crescimento das colônias algais, as culturas separadas foram plaqueadas novamente em meio LC Oligo (AFNOR, 1980) sólido e em seguida, o isolado foi inoculado em meio BG-11 modificado (ALLEN, 1968; ALLEN; STANIER, 1968; RIPPKA et al., 1979) para crescimento. Após o isolamento foi realizada a aclimatação desta cepa isolada no efluente recém-coletado e autoclavado a 120°C por 40 minutos e mantido na incubadora de DBO (Solab SL – 224) a 34°C, fotoperíodo de 12 horas e iluminação de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Tanto o consórcio quanto os isolados eram repicados semanalmente com efluente recém-coletado para manutenção dos inóculos. Esta fase inicial foi realizada com o auxílio do aluno de mestrado do programa de Biotecnologia da UFSCAR Matheus Darone Fronteira, ele foi responsável pelo isolamento das microalgas e parte dos repiques semanais.

#### 4.2.1.2. *Chlorella sorokiniana*

A cepa de *Chlorella sorokiniana* foi adquirida da coleção de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas, Departamento de Botânica, UFSCAR e mantida em meio M-8A (MANDALAM; PALSSON, 1998). Antes de ser inoculada na água negra tratada anaerobicamente foi realizada a adaptação desta cepa no efluente recém-coletado por duas gerações (2 semanas), com um repique após sete dias. Esta adaptação foi realizada na sala de cultivo do LATAR, apresentada no item 4.2.2, com iluminação de 120 a  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 12/12 horas.

#### 4.2.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

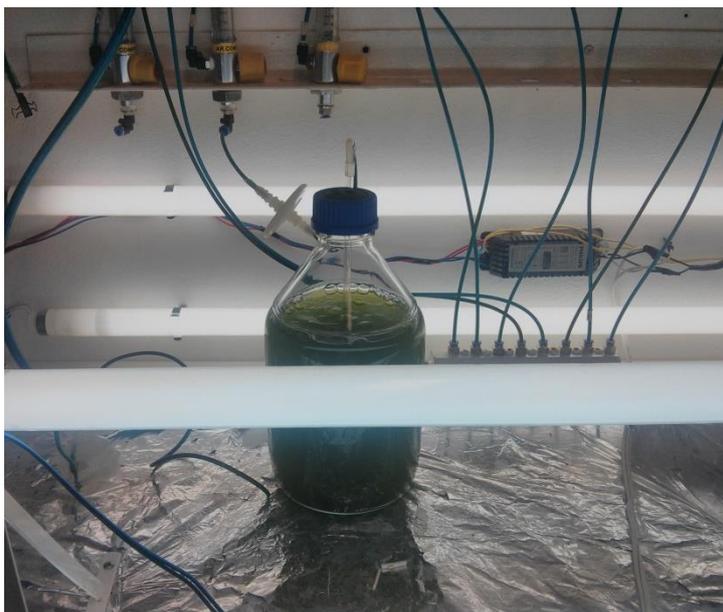
Para a avaliação do desempenho dos diferentes inóculos algais quanto ao crescimento e à remoção de nutrientes na água negra tratada anaerobicamente, sistemas de cultivo (fotobiorreatores) foram montados em escala laboratorial usando frascos de vidro de volume de dois litros, 13 cm de diâmetro e 26 cm de altura, em uma sala de cultivo com iluminação artificial e temperatura ambiente localizada no LATAR (Figura 5).

A sala possui um sistema de aeração composto por um compressor de ar, mangueiras de poliuretano e rotômetros para regular a vazão de ar, além de um cilindro de gás carbônico para o enriquecimento do cultivo (Figura 6). O compressor e o cilindro de CO<sub>2</sub> ficam do lado de fora da sala, o ar comprimido passa por um galão de 20 litros contendo água deionizada para umidificação e em seguida por um rotômetro com vazão de 0 a 2000 litros por hora (Omel®) antes de entrar na sala, sendo duas entradas diferentes, uma mangueira apenas com ar comprimido e outra com a mistura de ar comprimido e gás carbônico. A regulagem da vazão do CO<sub>2</sub> é feita antes da mistura por meio de um rotômetro com vazão de 0 a 500 ml.min<sup>-1</sup> (Dayer®). Dentro da sala existem rotômetros de 0 a 3 L.min<sup>-1</sup> (Morya®) para o controle da aeração de cada fotobiorreator. A iluminação da segunda etapa do experimento foi feita com quatro lâmpadas fluorescentes de 40 watts, em média 40 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> de luz.

A montagem das garrafas de vidro foi realizada da seguinte forma, para vedação foi usada uma borracha com três furos para entrada da aeração e trocas de gases e uma tampa tipo rosca aberta em cima para prender a borracha (Figura 7). A aeração foi feita com uma mangueira de 4 mm de diâmetro ligada ao rotômetro, sendo que este era ligado à mangueira de ar comprimido vindo de fora da sala, e à um tubo de vidro,

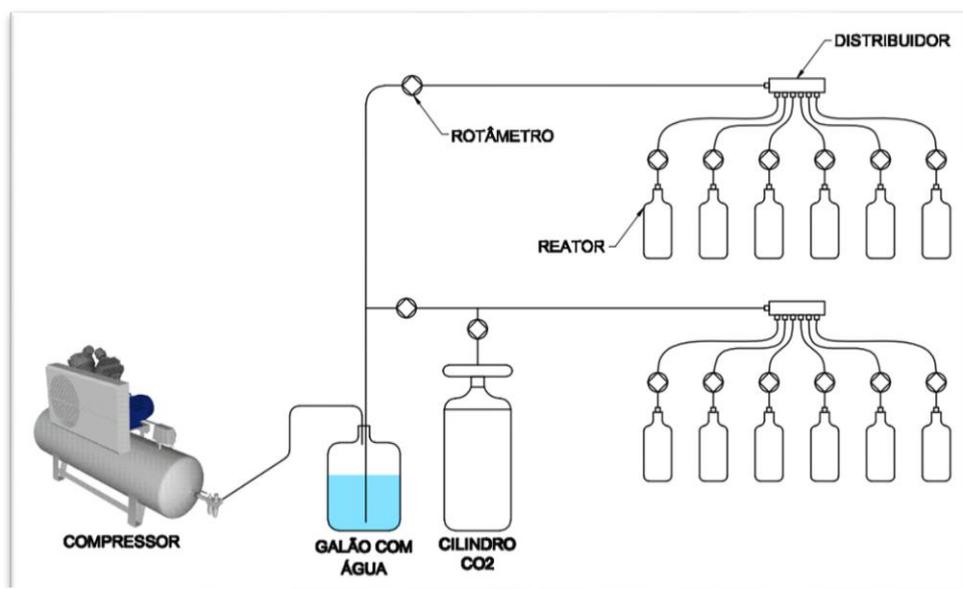
contendo uma membrana de  $0,22\ \mu\text{m}$  entre eles para filtração do ar vindo do compressor. O tubo de vidro era inserido em um furo da borracha de vedação até o fundo da garrafa e possuía uma pedra porosa de aquário na ponta para diminuir a dimensão das bolhas de ar. As amostras eram coletadas com uma seringa ligada ao tubo de vidro que era mantido dentro da garrafa.

**Figura 5** – Local de cultivo das microalgas utilizado nos experimentos localizado no LATAR com os rotômetros para controle da aeração e iluminação artificial.



Fonte: autora.

**Figura 6** – Sistema de aeração da sala de cultivo localizada no LATAR utilizado nos experimentos.



Fonte: autora.

**Figura 7** – Garrafa de vidro utilizada como fotobiorreator com aeração e coleta de amostras com tubos de vidro.



Fonte: autora.

O experimento foi composto por três bateladas usando como inóculo o consórcio de microalgas obtido na Etapa I. Cada batelada durava sete dias e era composta por fotobiorreatores aerados com ar comprimido e outros com ar comprimido enriquecido com 5% ( $50 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ) de gás carbônico, em triplicata. A temperatura ambiente foi medida por meio de um termômetro digital com as mínimas e máximas de cada dia. O fotoperíodo foi de 12/12 horas de claro e escuro e era controlado por um timer analógico e a aeração foi o correspondente a 0,5 vvm (volume de ar por volume de líquido por minuto - 1 litro ar/minuto).

No início de cada batelada, era feita a contagem de células do inóculo mantido no DMP. Os fotobiorreatores eram inoculados de forma que a concentração inicial fosse  $1 \times 10^5 \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$  de microalgas. Em seguida, após a homogeneização, as amostras para as análises iniciais eram coletadas e o sistema de aeração e iluminação na sala de cultivo eram ligados.

O monitoramento do cultivo foi feito por meio de análises para determinar o crescimento das microalgas (clorofila a, peso seco, absorvância e contagem de células),

análises físico-químicas para determinar as características do efluente (pH, série de nitrogênio, fósforo total e fósforo inorgânico). As coletas eram feitas no período da manhã (entre 8:00 e 9:00 horas da manhã) nos dias 0, 1, 2, 5, 6 e 7 de cultivo, aos sábados não havia coleta e aos domingos apenas amostras de clorofila e amostras para contagem de células.

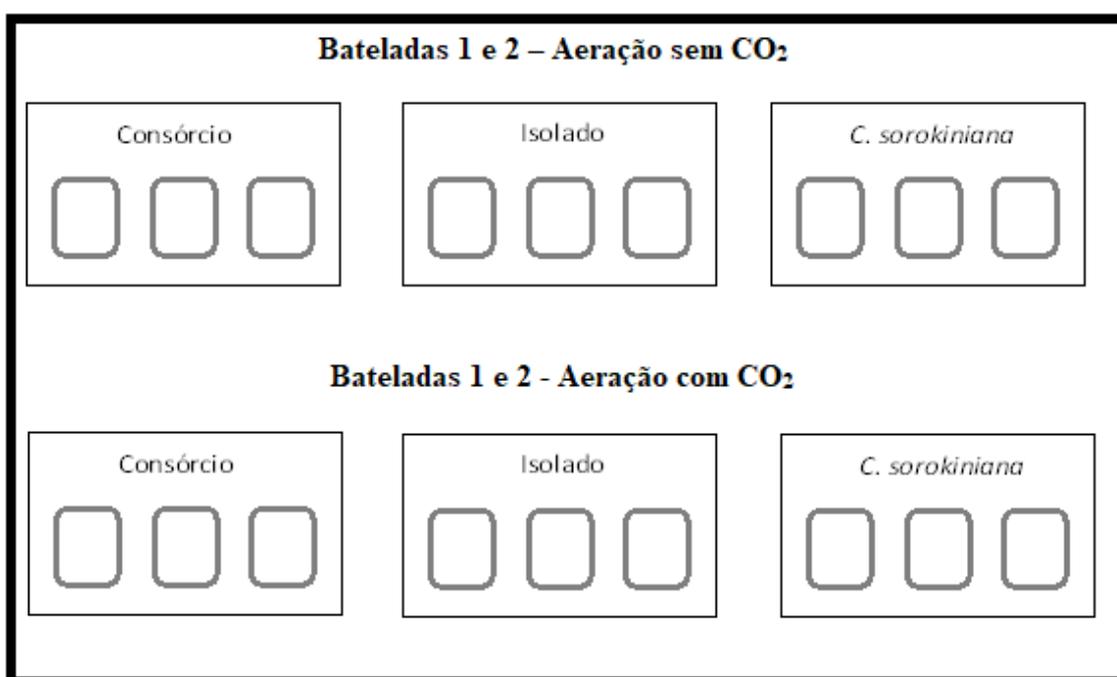
O efluente do reator UASB usado nos cultivos era coletado no dia anterior da batelada e caracterizado por meio de análises de demanda química de oxigênio (Método colorimétrico com refluxo fechado – APHA, 2012), pH, alcalinidade (Método potenciométrico – APHA, 2012), Fósforo Inorgânico (Método colorimétrico com ácido ascórbico – APHA, 2012) e Nitrogênio Amoniacal (Análise em sistema de injeção de fluxo colorimétrico – APHA, 2012).

#### 4.2.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Na Etapa III foram realizadas duas bateladas com aeração apenas com ar comprimido e duas aeradas com ar enriquecido com 5% de CO<sub>2</sub>, nas mesmas concentrações da Etapa II. Cada batelada foi composta por três inóculos diferentes cultivados na água negra tratada anaerobicamente: (1) consórcio originário do efluente, (2) um isolado deste consórcio e (3) *Chlorella sorokiniana*. As quatro bateladas foram realizadas com os fotobiorreatores em triplicata (Figura 8). A montagem do sistema de aeração e reatores foram iguais à Etapa II descrito no item 4.2.2. A iluminação da terceira etapa do experimento foi feita com seis lâmpadas fluorescentes de 40 watts, com 120 a 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz, sendo maior em relação à Etapa II. A temperatura e a luz da sala foram medidas por meio de um sensor (HOBO Pendant®) com registro de dados a cada hora.

No início da batelada os inóculos eram contados para que a concentração inicial de células nos reatores fosse de  $1 \times 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>, nesta fase os inóculos foram mantidos na sala de cultivo no LATAR para que ocorresse a adaptação destes no CO<sub>2</sub>. O inóculo inicial foi aumentado em relação à Etapa II para a obtenção de melhores resultados. Uma semana antes de iniciarem as bateladas com CO<sub>2</sub>, os inóculos eram aerados com ar enriquecido com 5% de CO<sub>2</sub> para adaptação destes.

**Figura 8** – Representação esquemática da terceira etapa do experimento.



### 4.3. ANÁLISES PARA QUANTIFICAÇÃO DAS MICROALGAS

#### 4.3.1. PESO SECO

A análise do peso seco foi feita nos dias 0, 1, 5, 6 e 7 de cultivo na Etapa II. Na Etapa III foi realizada apenas nos dias 0 e 7, devido à presença de sólidos no efluente que interferem na análise, tornando-a uma medida indireta do crescimento das microalgas. Para a determinação do peso seco foi utilizado o método de filtração em membrana de fibra de vidro GF-4 47 mm com poro de 0.45 µm, de acordo com APHA (2012). Para tanto, as membranas eram previamente lavadas com 50 mL de água

deionizada, secas em estufa a 65 °C por 24 horas, esfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e, então, pesadas (P1). Após esse preparo das membranas, 20 mL da suspensão de algas eram filtrados. Então, a membrana com a biomassa algal era seca em estufa a 65 °C por 24 horas, esfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada (P2). O peso seco (PS) corresponde à diferença entre P2 e P1, ou seja:  $PS = P2 - P1$ .

#### 4.3.2. CLOROFILA *a*

A clorofila foi feita apenas na Etapa III com a metodologia de extração com acetona segundo APHA (2012) nos dias 0, 1, 2, 5, 6 e 7. As amostras eram filtradas no dia de coleta em membrana de fibra de vidro GF/F Ø 0,7µm e congeladas por no máximo 60 dias.

A extração era feita com maceração da membrana com acetona e solução saturada de carbonato de magnésio na proporção 9:1, respectivamente. Após isso, as amostras eram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, colocadas na câmara fria a 4°C e após 24 horas eram lidas. A leitura era realizada por meio de um espectrofotômetro (DR 5000 - HACH) nos comprimentos de onda de 664 e 750 nm, em seguida as amostras eram acidificadas com ácido clorídrico 2% e lidas nos comprimentos de onda 665 e 750 nm.

Os valores de concentração de clorofila-a são obtidos pela seguinte equação:

$$Cla = \frac{26,7x(664b - 665a)xV1}{V2xL}$$

Onde:

664b: subtração da absorbância obtida em 664nm e 750nm

665a: subtração da absorbância obtida em 664nm e 750nm

V1: volume da acetona

V2: volume do filtrado da amostra

L: caminho óptico da cubeta (1 cm)

#### 4.3.3. DENSIDADE ÓPTICA

A densidade óptica foi medida por meio de um espectrofotômetro (DR 5000 - HACH) no comprimento de onda 682 nm no qual a luz é absorvida pela clorofila-a, segundo Kliphuis et al. (2010).

#### 4.3.4. CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS

Para acompanhar o crescimento das microalgas no efluente foram realizadas amostragens diárias. As amostras foram fixadas em microtubos com formaldeído 4% com volume de 10% (v/v) e mantidas na câmara fria (4°C) para contagem posterior das células e esta foi feita usando um microscópio óptico e a Câmara de Contagem de Fuchs-Rosenthal (KASVI®).

Na Etapa II do trabalho as triplicatas foram contadas individualmente e foi feita a média e desvio padrão entre elas. Na Etapa III as amostras de cada reator da triplicata foram misturadas na mesma proporção e contadas em conjunto, não havendo média destes.

#### 4.3.4. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO ( $d^{-1}$ )

A taxa de crescimento específico geral determina qual é o crescimento em um determinado período de tempo e é definida pela seguinte equação:

$$\mu = \frac{(\ln N_2 - \ln N_1)}{T_2 - T_1}$$

Onde, N1 e N2 correspondem à medida de crescimento utilizada. Neste trabalho foi feita com a contagem de células nos dias T1 e T2 (GUILLARD, 1973).

A taxa de crescimento na fase exponencial representa a maior taxa de crescimento que uma microalga vai apresentar quando totalmente aclimatada àquelas

condições ambientais. Esta foi calculada por meio da representação gráfica do log natural (Ln) do número de células em função do tempo de cultivo e cálculo de regressão linear. O coeficiente angular da reta representa a taxa de crescimento específica, de acordo com a equação (ANDERSEN, 2005):

$$y = ax$$

Onde:

$y$  = Ln da concentração de células (cél.ml<sup>-1</sup>)

$a$  = taxa de crescimento (cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>)

$x$  = tempo de cultivo (dias)

#### 4.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para a avaliação e acompanhamento de mudanças nas concentrações dos nutrientes no experimento foram realizadas diariamente (exceto sábado e domingo) análises de Fósforo inorgânico (Método colorimétrico com ácido ascórbico – APHA, 2012), Nitrogênio Amoniacal e pH (APHA, 2012). No primeiro e último dia de cultivo foi realizada a determinação de Nitrato e Nitrito (Análise em sistema de injeção em fluxo colorimétrico com redução em coluna de cádmio – APHA, 2012) e a Série de Sólidos Suspensos Totais (APHA, 2012).

#### 4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram analisados usando o programa Microsoft Excel 2010, calculando-se a média, a variância e o desvio padrão. Os reatores em triplicata foram tratados como réplicas nos cálculos de média e desvio padrão.

Para avaliação de diferenças entre os inóculos e as bateladas o teste estatístico *t de Student* foi realizado com um valor de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

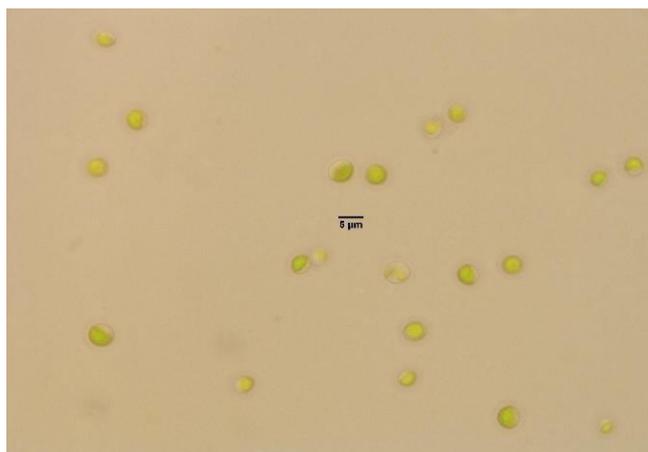
Os resultados e discussões apresentados neste item estão divididos de acordo com as Etapas I, II e III (item 4.2) que foram realizadas.

### 5.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS

Entre as vantagens do uso de microalgas nativas do efluente a ser tratado está a adaptação às concentrações de nutrientes, a possíveis poluentes tóxicos presentes no efluente e aos microrganismos presentes. Nesse sentido, o consórcio obtido a partir da água negra tratada anaerobicamente teve predominância de microalgas verdes do tipo cocoide, com tamanho variando de 2 a 5  $\mu\text{m}$  (Figura 9).

Halfhide et al. (2015) isolaram de um lodo de tratamento anaeróbico de esgoto municipal um consórcio de microalgas com predominância (95%) de *Chlorella* para recuperação de nutrientes do lodo e obtiveram 91% de remoção de amônia, associando este resultado a adaptação das microalgas à alta concentração de amônia do lodo (250  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

**Figura 9** – Consórcio de microalgas isoladas da água negra tratada anaerobicamente vistas no microscópio óptico em (aumento de 100x).



Fonte: autora.

Após o plaqueamento do consórcio foram observados dois tipos morfológicos visualmente diferentes na placa. Cada cepa foi inoculada em meio BG-11 e denominadas de Isolado 1 e Isolado 2 (Figura 10). Para escolher qual isolado seria

utilizado na Etapa III, estes foram inoculados para que a concentração inicial fosse de  $1 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup> na água negra tratada anaerobicamente. Após sete dias o número de células foi contado novamente, o Isolado 1 chegou a concentração de  $4,2 \times 10^5$  cél.ml<sup>-1</sup> e o Isolado 2, a  $7,3 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup>. Devido ao maior crescimento do Isolado 2, demonstrando melhor adaptação a água negra tratada anaerobicamente, este foi utilizado na Etapa III.

**Figura 10** – Isolado 1 (esquerda) e Isolado 2 (direita) em meio BG-11.



Fonte: autora.

## 5.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Neste item, os reatores aerados somente com ar comprimido foram nomeados de AR e os reatores aerados com ar + CO<sub>2</sub> 5% foram nomeados de CO<sub>2</sub> para facilidade de entendimento. As bateladas 1, 2 e 3 estão identificadas como B1, B2 e B3, respectivamente.

A temperatura ambiente foi monitorada durante os dias de cultivo por meio de um termômetro digital que registrava as máximas e mínimas de cada dia. Na Tabela 2 estão as temperaturas mínima, máxima e média de cada batelada. A amplitude térmica nas Bateladas 1, 2 e 3 foi de 11,9, 11,8 e 10,4°C, respectivamente. As temperaturas mínima e máxima mantiveram-se próximas entre as 3 bateladas. Os trabalhos em escala laboratorial na literatura são realizados com temperatura controlada, porém, neste trabalho, os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente para aproximar-

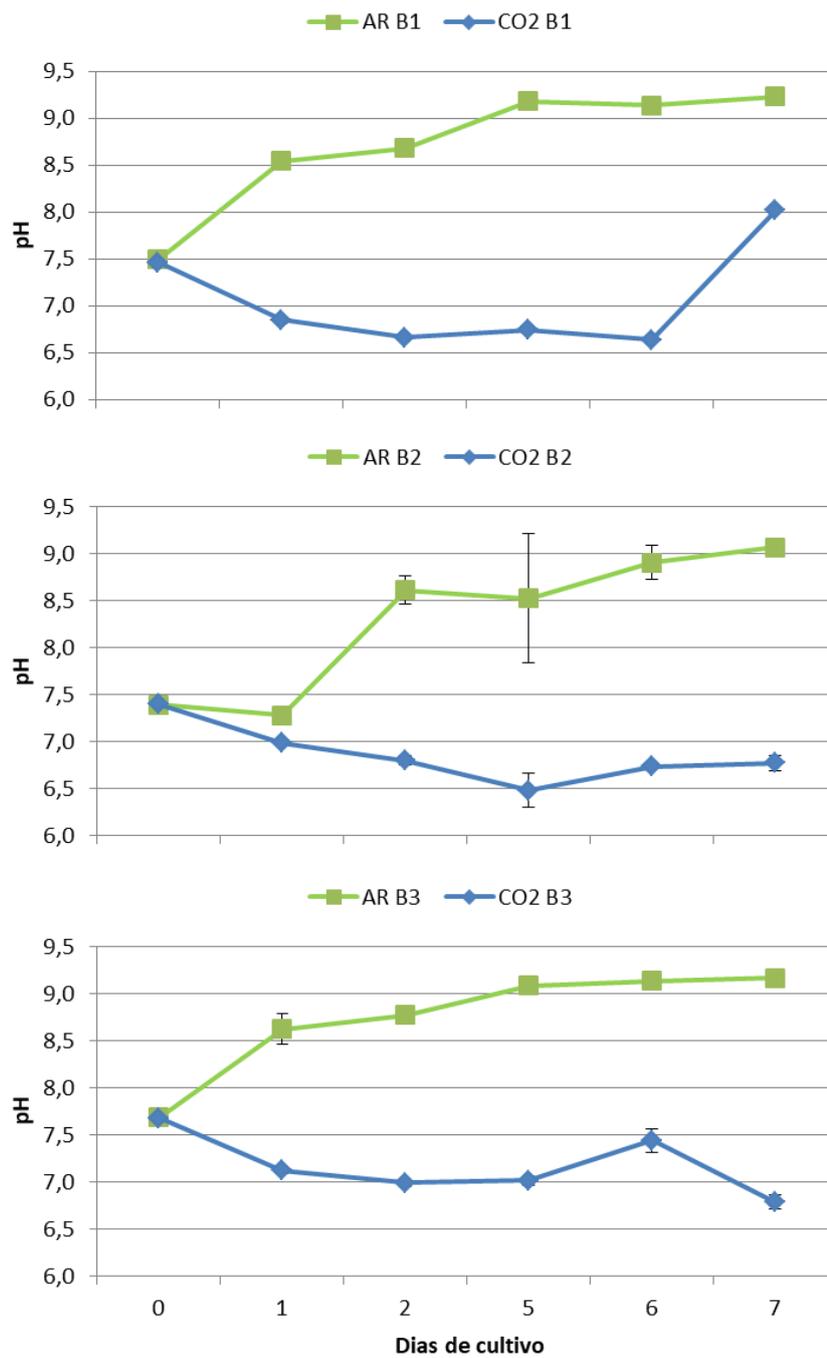
se do que ocorre em escala real, quando os fotobiorreatores são mantidos em ambiente externo.

**Tabela 2** – Temperaturas máxima, mínima, média e desvio padrão nas Bateladas 1, 2 e 3 durante a Etapa II.

Temperatura	BATELADA 1	BATELADA 2	BATELADA 3
MÍNIMA	25,5 °C	24,1 °C	25,0 °C
MÁXIMA	37,4 °C	35,9 °C	35,4 °C
MÉDIA	31,4 °C $\pm$ 3,2	31,0 °C $\pm$ 3,1	30,9 °C $\pm$ 2,4

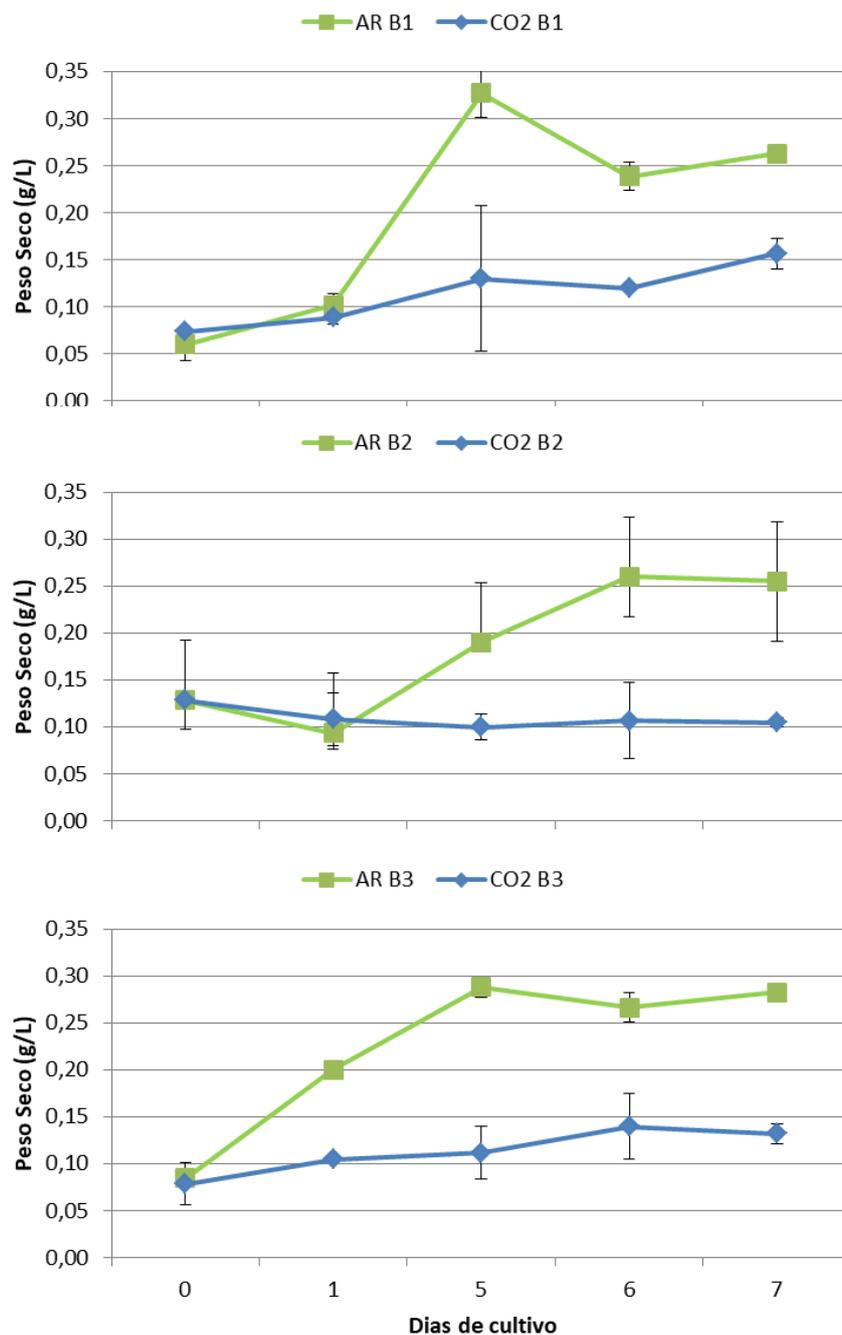
Os valores de pH (Figura 11) tiveram um aumento ao longo dos dias de cultivo nos reatores AR das três bateladas, chegando a  $9,2 \pm 0$  nas Bateladas 1 e 3 e  $9,1 \pm 0,1$  na B2 no último dia de cultivo. Nos reatores CO<sub>2</sub> os valores de pH tiveram um declínio durante os dias de cultivo chegando a  $6,8 \pm 0$  na B2 e  $6,8 \pm 0,1$  na B3 no último dia. O reator CO<sub>2</sub> na B1 no último dia teve um aumento no pH atingindo o valor de  $8,0 \pm 0$ , isto ocorreu devido a um erro no sistema de fornecimento de CO<sub>2</sub> para os cultivos que parou do sexto para o sétimo dia.

As tendências nos valores de pH observadas são esperadas e estão relacionadas à atividade das microalgas. O aumento do pH nos reatores AR pode estar associado aos mecanismos de consumo de carbono orgânico nas formas de glicose e acetato presentes no meio. Para que ocorra o consumo da glicose, esta é transportada para dentro da célula por meio de um sistema que utiliza H<sup>+</sup> do meio, aumentando o pH. Em relação ao acetato, durante o consumo de acetatos de sódio ou potássio, as formas Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> são liberadas para o meio e juntam-se a ânions, formando compostos alcalinizantes (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Por outro lado, nos reatores CO<sub>2</sub> o pH dos cultivos diminui porque quando o gás é transformado em HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> em meio líquido, ocorre a liberação de H<sup>+</sup> (ANDRADE; CAMERINI; COSTA, 2008).

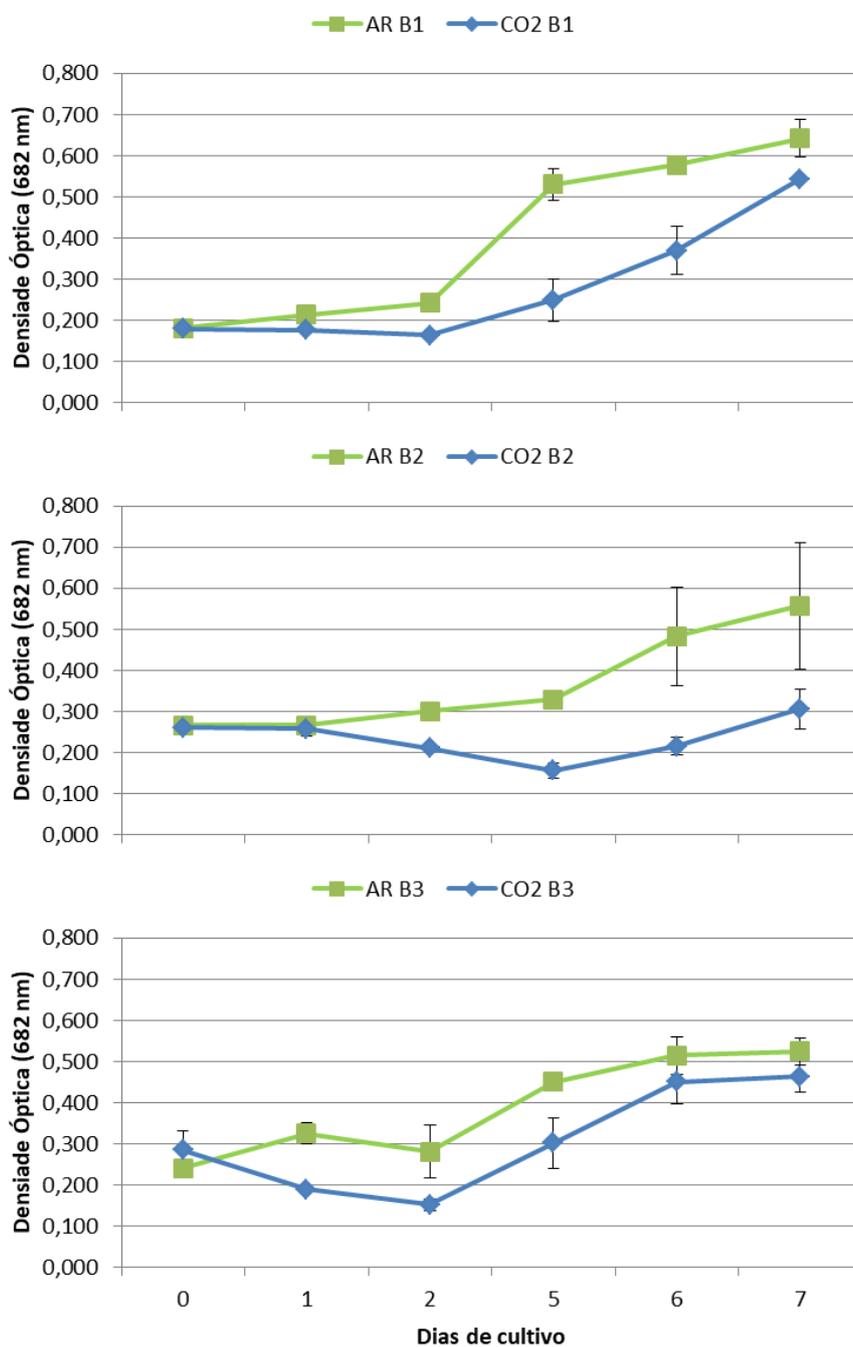
**Figura 11** - pH das Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.

O maior peso seco foi observado no reator AR da Batelada 1 no quinto dia de cultivo, com  $0,32 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ . O mesmo ocorreu no AR Batelada 3, que estabilizou o peso seco no quinto dia com  $0,28 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ . O AR B2 atingiu  $0,25 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$  no último dia. Houve diferença significativa entre os reatores AR B1 e AR B3 apenas. Os reatores CO<sub>2</sub> B1, B2 e B3 obtiveram  $0,15 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0,10 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,13 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  no sétimo dia de cultivo, respectivamente (Figura 13). Houve diferença significativa do CO<sub>2</sub> B2 em relação ao CO<sub>2</sub> B1, mas entre CO<sub>2</sub> B3 em relação a B1 e B2 não houve. Em relação aos reatores AR B1, B2 e B3 e CO<sub>2</sub> B1, B2 e B3 não houve diferença significativa apenas entre AR B2 e CO<sub>2</sub> B2.

Na densidade óptica de 682 nm (DO<sub>682</sub>) nos reatores AR nas Bateladas 1, 2 e 3 a DO<sub>682</sub> chegou a  $0,64 \pm 0,05$ ,  $0,55 \pm 0,15$  e  $0,52 \pm 0,03 \text{ nm}$ , respectivamente. Houve diferença significativa entre os reatores AR B1 e AR B3 apenas. Nos reatores CO<sub>2</sub>, nas Bateladas 1, 2 e 3 a DO<sub>682</sub> chegou a  $0,58 \pm 0,06$ ,  $0,30 \pm 0,05$  e  $0,51 \pm 0,08 \text{ nm}$ , respectivamente, ficando pouco abaixo dos reatores AR (Figura 14). Houve diferença significativa entre os reatores CO<sub>2</sub> B1 e B2 apenas. Não houve diferença significativa entre as Bateladas 1, 2 e 3 AR em relação às respectivas Bateladas 1, 2 e 3 CO<sub>2</sub>.

**Figura 12** – Peso seco das Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.

**Figura 13** – Densidade óptica (682 nm) nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.

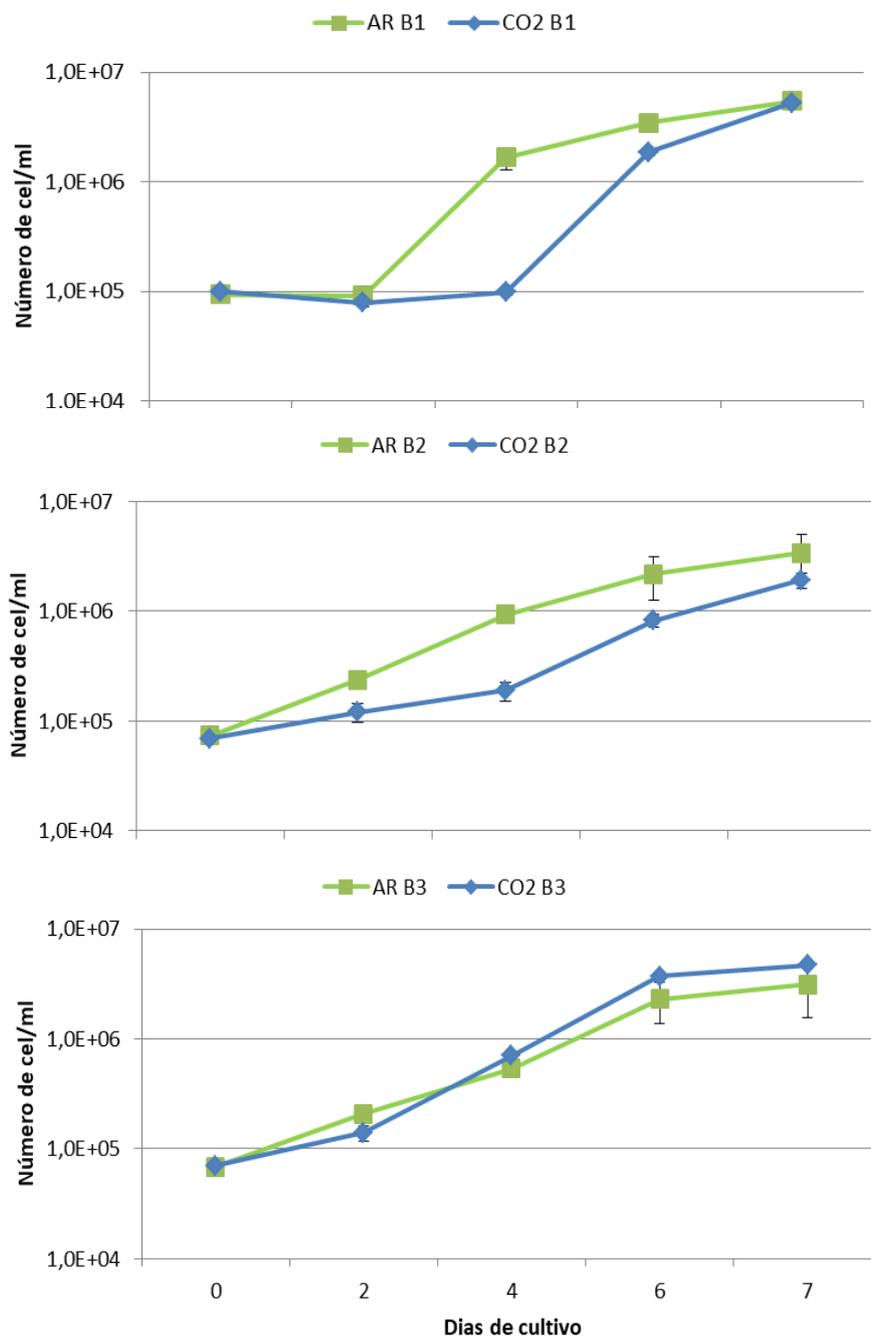


O número de células por mililitro apresentou um comportamento semelhante em todos os reatores. As diferenças observadas foram nos reatores CO<sub>2</sub> B1 e CO<sub>2</sub> B2 que mantiveram a fase de adaptação até o quarto dia, enquanto os reatores AR B1, B2 e B3 e CO<sub>2</sub> B3 apresentaram crescimento exponencial entre os dias 2 e 7 de cultivo. Todos os

reatores chegaram a  $10^6$  células.ml<sup>-1</sup> (Figura 15). Nos reatores AR houve diferença significativa entre AR B1 e AR B3 apenas. Nos reatores CO<sub>2</sub> houve diferença significativa entre o CO<sub>2</sub> B2 em relação aos reatores B1 e B3, mas não entre estes últimos. No entanto, não houve diferença significativa entre as Bateladas 1, 2 e 3 AR em relação às Bateladas 1, 2 e 3 CO<sub>2</sub>.

Nas análises de contagem de número de células e DO<sub>682</sub> não houve diferença significativa de crescimento no último dia de cultivo entre os reatores AR e CO<sub>2</sub>. No entanto, na análise de peso seco os reatores AR apresentaram maior peso seco significativamente em relação aos reatores CO<sub>2</sub>. Isto pode ser devido à análise de peso seco representar uma medida indireta das microalgas, visto que na membrana ficam retidos sólidos e outros microrganismos, podendo ocasionar erros de quantificação.

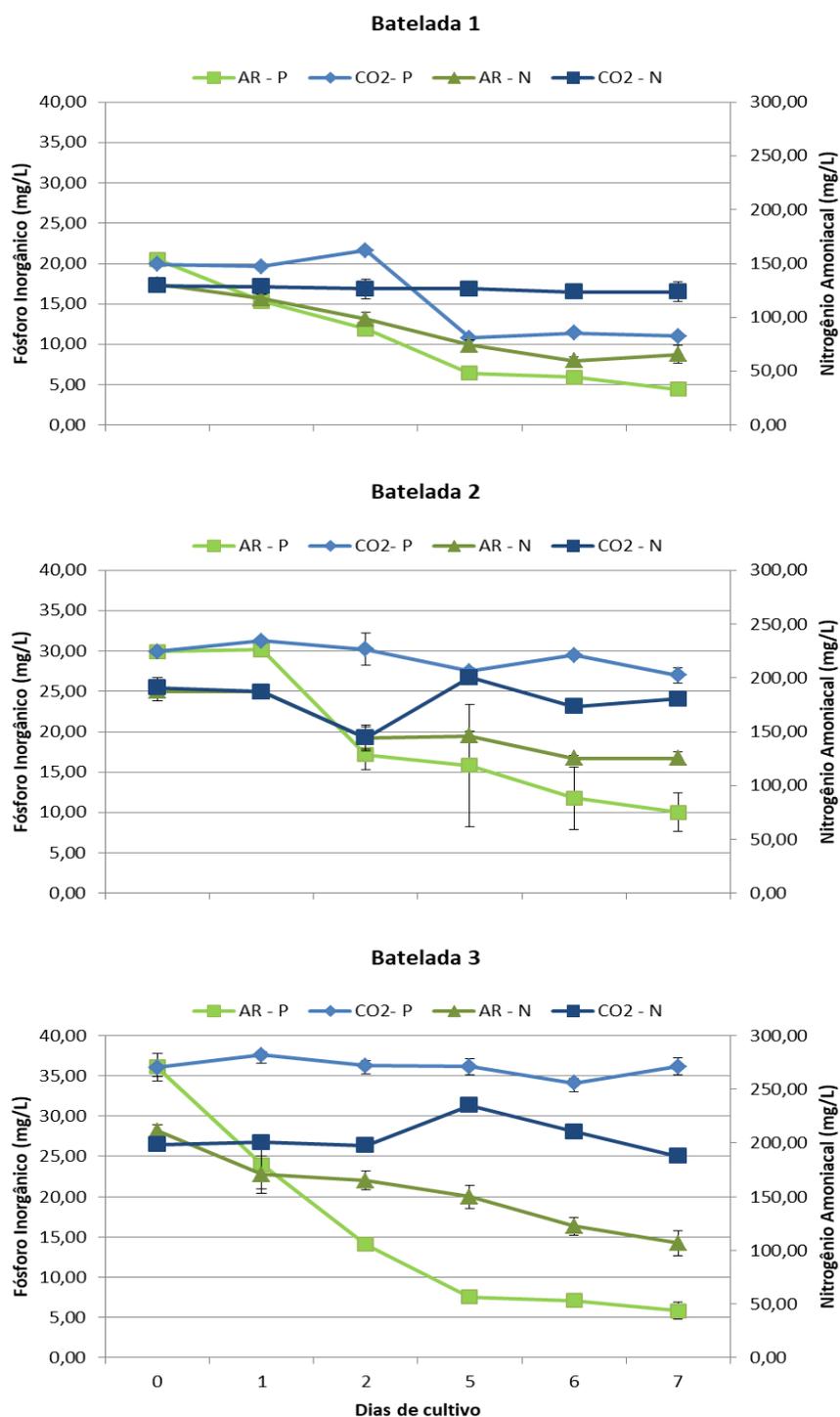
**Figura 14** – Número de células por mililitro nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.



Com relação ao fósforo inorgânico, os reatores AR removeram mais fósforo em relação aos reatores CO<sub>2</sub>, existindo diferença significativa entre as remoções nas três Bateladas. Os reatores AR B3 apresentaram maior remoção de fósforo inorgânico (84%) durante os sete dias de cultivo, seguido do AR B1 com 78% e do AR B2 com 66% de remoção. Houve diferença significativa entre estes últimos e o AR B3, mas não houve entre o AR B1 e o AR B2. Nos reatores CO<sub>2</sub> ocorreram as menores remoções de fósforo inorgânico, com 45% na B1, 9% na B2 e 0% na B3, com diferença significativa entre todos e entre estes e os reatores AR. O maior consumo de fósforo em todos os reatores ocorreu até o quinto dia, não demonstrando grandes alterações após este dia (Figura 12).

O nitrogênio amoniacal, semelhante ao fósforo inorgânico, apresentou melhor remoção nos reatores AR em relação aos reatores CO<sub>2</sub>, havendo diferença significativa entre eles. Os reatores AR na Batelada 1 removeu 49%, na Batelada 2, 33% e na Batelada 3, 49%. Houve diferença significativa entre o AR B1 e o AR B3 em relação ao AR B2, sendo os primeiros maiores em relação a este. Nos reatores CO<sub>2</sub> as remoções variaram de 4 a 5% nas três bateladas, sem diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre eles (Figura 12).

**Figura 15** - Fósforo inorgânico e nitrogênio amoniacal nas Bateladas 1, 2 e 3 da Etapa II durante os sete dias de cultivo.



O crescimento algal é influenciado por vários parâmetros, entre eles, a concentração de nutrientes e a intensidade luminosa. Com relação aos nutrientes, as porcentagens de remoção de N e P observadas neste trabalho foram menores que as reportadas por Drexler et al. (2014). Estes autores cultivaram *Chlorella sorokiniana* e uma comunidade de microalgas isoladas do efluente de um reator de remoção de Demanda Bioquímica de Oxigênio tratando esgoto sanitário utilizado no cultivo destas, com 12 dias de duração, fotoperíodo de 12/12 horas e iluminação de 3000 lux ( $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), em frascos Erlenmeyer com 500 ml sem aeração. Obtiveram 98 e 88% de remoção de nitrogênio amoniacal com a *C. sorokiniana* e com a comunidade de microalgas, respectivamente e 96 e 98% de remoção de fósforo inorgânico.

Por outro lado, os resultados encontrados por Kim et al. (2013) são semelhantes aos obtidos na Etapa II deste trabalho. Estes autores cultivaram a *C. sorokiniana* em meio de cultura (*Proteose Medium*) com concentrações de nitrogênio e fósforo de 200 e 50  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente, com adição de 5 g de glicose no cultivo heterotrófico e no mixotrófico. Além da glicose, no crescimento mixotrófico foi acrescentado  $\text{NHCO}_3$  como fonte de carbono inorgânico e a iluminação de  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . A maior taxa de crescimento ( $0,53 \text{ d}^{-1}$ ), e maiores remoções de 48% de nitrogênio total ( $23,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e 40% de fósforo total ( $5,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) ocorreram no cultivo heterotrófico em relação ao mixotrófico. Este resultado foi atribuído à baixa intensidade de luz no cultivo.

A relação da intensidade luminosa relacionada ao crescimento autotrófico de microalgas foi testada por Thawechai et al. (2016). Os autores avaliaram as intensidades luminosas 47, 60 e  $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  com fotoperíodos variando de 12 a 24 horas usando enriquecimento de 20% de  $\text{CO}_2$  no crescimento da microalga *Nannochloropsis* sp. Nas intensidades luminosas de 47 e  $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , foi observado um baixo crescimento

com o fotoperíodo de 12h e o máximo no fotoperíodo de 24h, pois com baixas intensidades luminosas o aumento do fotoperíodo suprime a falta de luz.

Com relação à luz, Mousavi et al. (2018) utilizaram efluente de esterco bovino autoclavado após separação de sólidos para o cultivo de uma microalga isolada do efluente, identificada como *Coelastrum* sp. para comparar diferentes intensidades de luz com suplementação de CO<sub>2</sub> em cultivo mixotrófico. As intensidades de luz utilizadas foram de 1000 a 10.000 lux (13,5 a 135  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), o maior crescimento de biomassa foi observado na intensidade luminosa de 6.900 lux (93  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) com peso seco de 2,47 g.L<sup>-1</sup>, maior em relação ao maior peso seco encontrado nesta etapa deste trabalho (0,32 g.L<sup>-1</sup>) no cultivo heterotrófico.

Além da disponibilidade de nutrientes e da intensidade luminosa, outros parâmetros podem interferir no uso do gás carbônico nos cultivos de microalgas (AL KETIFE et al., 2017). Chiu et al. (2008) avaliaram por um experimento a influência da densidade inicial de células nos cultivos e sua relação com diferentes porcentagens de enriquecimento de CO<sub>2</sub>. Para o inóculo que designou ser de baixa densidade de células ( $8 \times 10^5$  cel.ml<sup>-1</sup>) obteve uma biomassa de  $0.537 \pm 0.016$  g.L<sup>-1</sup> somente com ar,  $1.211 \pm 0.031$  g.L<sup>-1</sup> com 2% e  $0.062 \pm 0.027$  g.L<sup>-1</sup> com 5%. Enquanto que para o inóculo de alta densidade de células ( $8 \cdot 10^6$  cel.ml<sup>-1</sup>) obteve melhores resultados, sendo o cultivo aerado com ar  $0.682 \pm 0.007$  g.L<sup>-1</sup>, com 2%  $1.445 \pm 0.015$  g.L<sup>-1</sup> e com 5%  $0.899 \pm 0.003$  g.L<sup>-1</sup>. Outro fator associado a maior eficiência do CO<sub>2</sub> foi a adaptação do inóculo com 2% de CO<sub>2</sub>.

Diferentes trabalhos utilizaram variados acréscimos de CO<sub>2</sub> na aeração, apresentando variados resultados de qual seria a melhor concentração para enriquecimento dos cultivos. Razaak et al. (2015) testaram concentrações de CO<sub>2</sub> de 4 a 12% da quantidade total de ar no crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*

em esgoto sintético obtiveram maior biomassa com 8% de CO<sub>2</sub>, porém maior taxa de crescimento com 4%. Este resultado foi atribuído à capacidade da microalga de suportar altas concentrações de CO<sub>2</sub> (8%), mas a melhor para o crescimento seria de 4%. Estes estudos testando diferentes concentrações de enriquecimento de CO<sub>2</sub> nos cultivos com a melhor porcentagem variando de 2 a 10% indicam que há uma alta especificidade de qual a concentração ideal para cada tipo de cultivo.

Nos resultados apresentados aqui foi observado o crescimento das microalgas semelhante nos cultivos heterotróficos e mixotróficos, no entanto as remoções de nutrientes foram maiores nos cultivos heterotróficos. De acordo com a literatura, a intensidade luminosa nesta Etapa foi considerada limitante para o crescimento das microalgas, interferindo nesta remoção de nutrientes. Outros fatores foram considerados como possíveis limitantes como o número inicial de células e a ausência de adaptação das microalgas em cultivo enriquecido com CO<sub>2</sub>.

Com base nestes resultados iniciais, para a realização da Etapa III as seguintes condições foram modificadas, a intensidade luminosa e o número de células inicial foram aumentados e os inóculos foram adaptados ao CO<sub>2</sub> antes do início do cultivo, como descrito no item 4.2.3.

### 5.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Neste tópico encontram-se os resultados da Etapa III da pesquisa, sendo que os dados das duas bateladas sem enriquecimento com CO<sub>2</sub> (cultivo heterotrófico) estão apresentados no item 5.3.1 e os dados das duas bateladas com injeção de CO<sub>2</sub> (cultivo mixotrófico) estão detalhados no item 5.3.2. Considerações sobre as diferenças observadas entre os cultivos heterotróficos e mixotróficos são discutidas no item 5.3.3.

### 5.3.1. BATELADAS DE CULTIVO SEM CO<sub>2</sub>

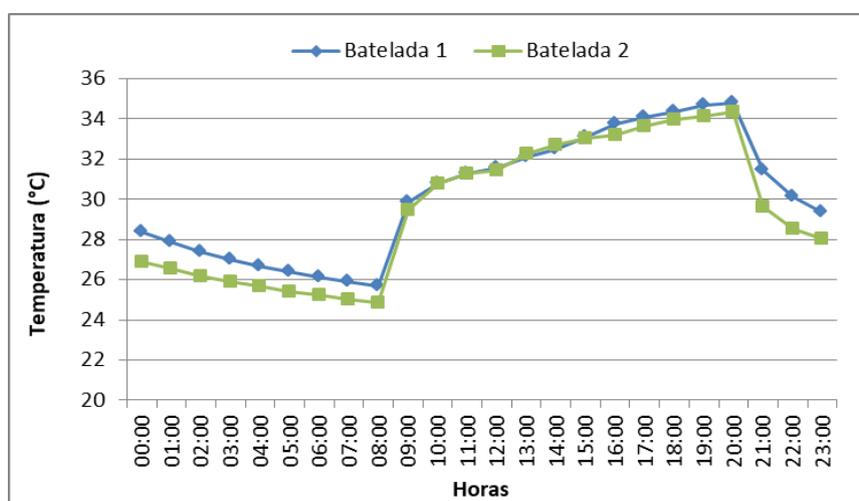
Os dados de monitoramento de temperatura mínima e máxima registradas durante os dias de cultivo e a temperatura média calculada das duas bateladas sem CO<sub>2</sub> encontram-se na Tabela 3. Na Batelada 1 as temperaturas mínima, máxima e média foram de 25,7, 35,2 e 30,2°C, respectivamente. Na Batelada 2, estas foram de 24,0, 35,5 e 29,4°C, respectivamente.

Na Figura 16 encontra-se a variação de temperatura de hora em hora em um dia típico durante as Bateladas 1 e 2. Nas duas Bateladas pode-se observar um aumento de temperatura significativo entre 8:00 e 9:00 horas da manhã e uma queda entre 20:00 e 21:00 horas da noite, representando o horário em que as lâmpadas eram ligadas e desligadas, respectivamente.

**Tabela 3** – Temperaturas máxima, mínima e média nas bateladas 1 e 2 sem CO<sub>2</sub> durante a Etapa III.

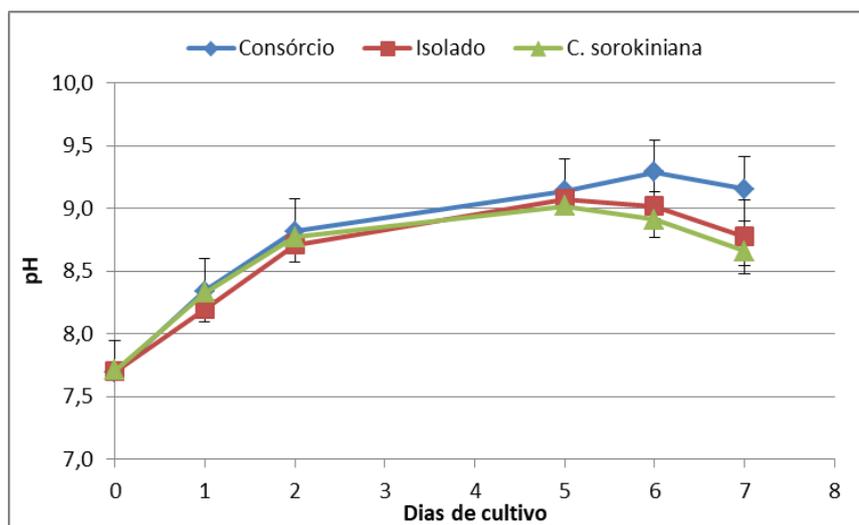
Temperatura	BATELADA 1	BATELADA 2
MÍNIMA	25,7 °C	24,0 °C
MÁXIMA	35,2 °C	35,5 °C
MÉDIA	30,2 °C ±2,7	29,4 °C ±0,4

**Figura 16** – Temperatura de hora em hora durante o quinto dia de cultivo na Batelada 1 e durante o segundo dia de cultivo da Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> durante a Etapa III.

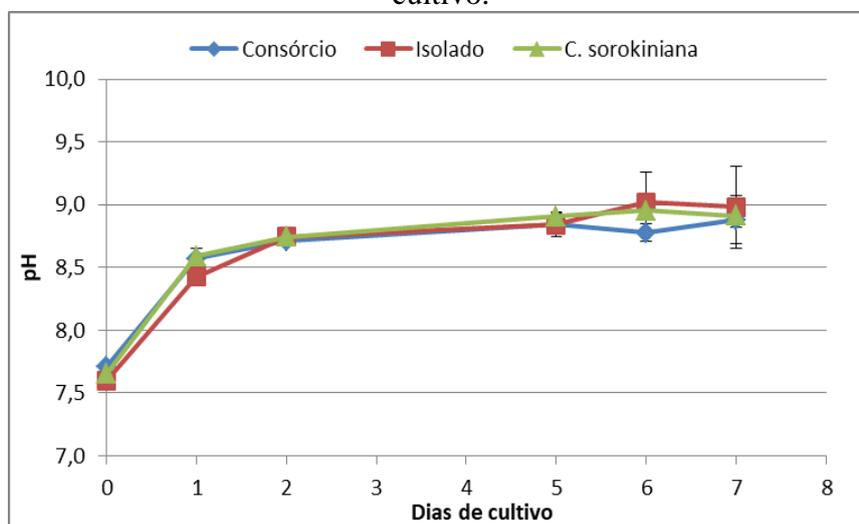


Os valores de pH apresentaram comportamento semelhante nas duas bateladas e, assim como na Etapa II. A ausência de controle de pH fez com que os valores aumentassem no decorrer do período de monitoramento devido à atividade das microalgas. Assim, na Batelada 1 os valores de pH atingiram a média de  $9,2 \pm 0,3$ ,  $8,8 \pm 0,3$  e  $8,7 \pm 0,1$  nos reatores inoculados com Consórcio, Isolado e *C. sorokiniana*, respectivamente (Figura 17). Na Batelada 2, os valores médios foram de  $8,8 \pm 0,1$  (reator inoculado com Consórcio),  $8,9 \pm 0,3$  (reator inoculado com Isolado) e  $8,9 \pm 0,0$  (reator inoculado com *C. sorokiniana*) (Figura 18).

**Figura 17** – Valores de pH da Batelada 1 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo.



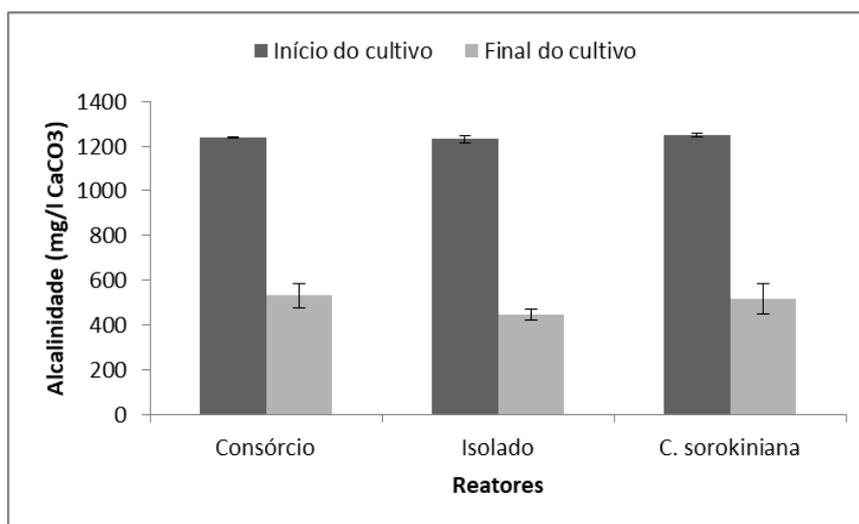
**Figura 18** - Valores de pH da Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo.

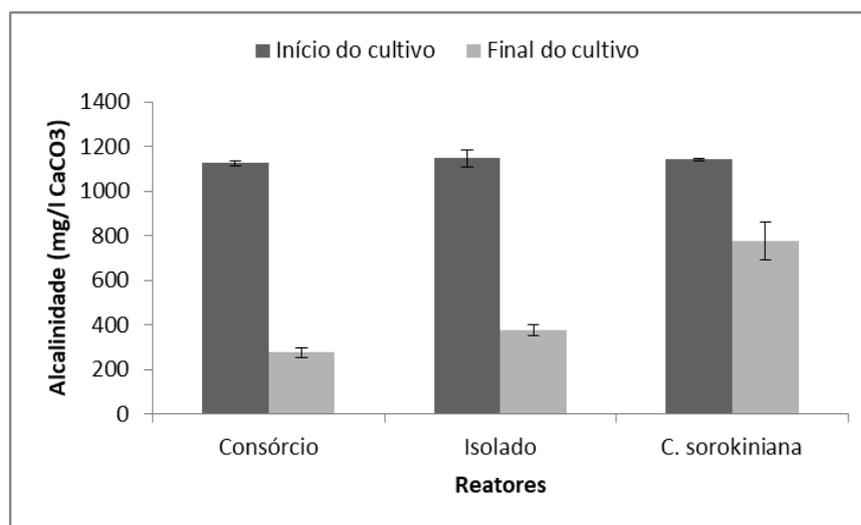


Nas figuras 19 e 20 encontram-se os valores iniciais e finais de alcalinidade nas Bateladas 1 e 2, respectivamente. Na Batelada 1, os valores de alcalinidade no início e final do cultivo nos reatores inoculados com o Consórcio foram, respectivamente,  $1.239,53 \pm 2,00$  e  $530,60 \pm 56,77$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , com o Isolado  $1.231,14 \pm 17,34$  e  $447,37 \pm 24,52$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , e com a *C. sorokiniana*  $1249,64 \pm 8,72$  e  $517,88 \pm 68,86$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ .

Na Batelada 2, os valores de alcalinidade no início e final do cultivo nos reatores inoculados com o Consórcio foram, respectivamente,  $1.127,10 \pm 10,40$  e  $276,28 \pm 20,32$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , com o Isolado  $1.149,06 \pm 38,20$  e  $374,54 \pm 24,52$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , e com a *C. sorokiniana*  $1.142,13 \pm 7,21$  e  $778,56 \pm 85,82$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ .

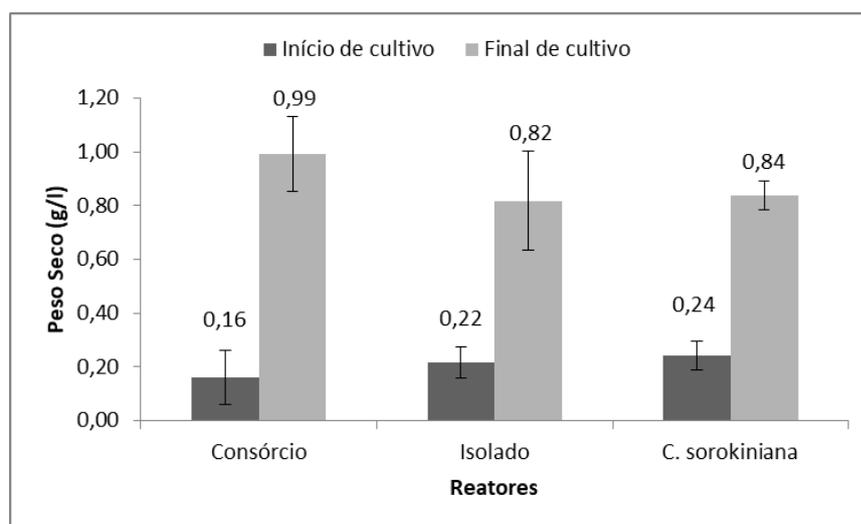
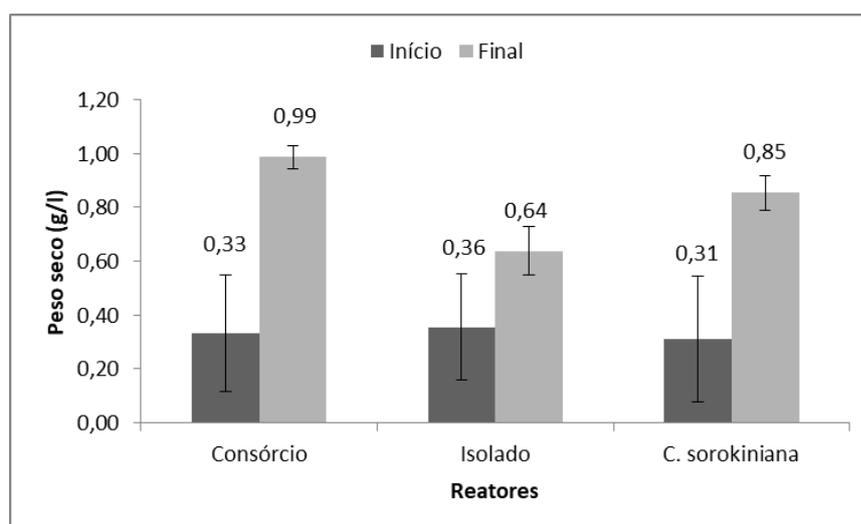
**Figura 19** – Alcalinidade total inicial e final da Batelada 1 sem  $\text{CO}_2$  da Etapa III.



**Figura 20** – Alcalinidade total inicial e final da Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.

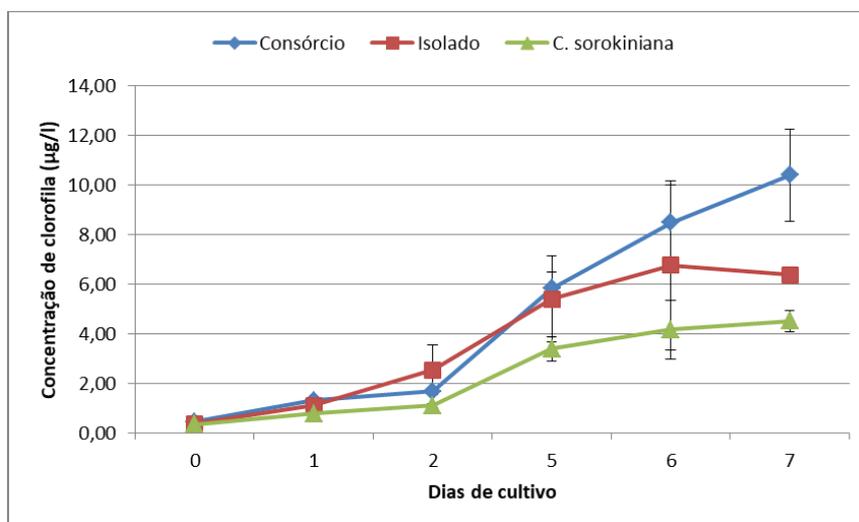
O monitoramento do crescimento das microalgas foi realizado por meio de análises de peso seco (Figuras 21 e 22), concentração de clorofila-a (Figuras 23 e 24), densidade óptica no comprimento de onda de 682 nm (Figuras 25 e 26) e contagem de células (Figuras 27 e 28).

As Figuras 21 e 22 apresentam os dados de peso seco para as Bateladas 1 e 2, respectivamente. Analisando os resultados da Batelada 1, os reatores inoculados com o Consórcio apresentaram valor de peso seco de  $0,99 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$  no último dia de cultivo, enquanto os reatores inoculados com o Isolado e com *C. sorokiniana* tiveram valores próximos:  $0,82 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,18$  e  $0,84 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,05$ , respectivamente. Na Batelada 2, os valores de peso seco no final do período de cultivo foram:  $0,99 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  (Consórcio),  $0,64 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$  (Isolado) e  $0,85 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$  (*C. sorokiniana*).

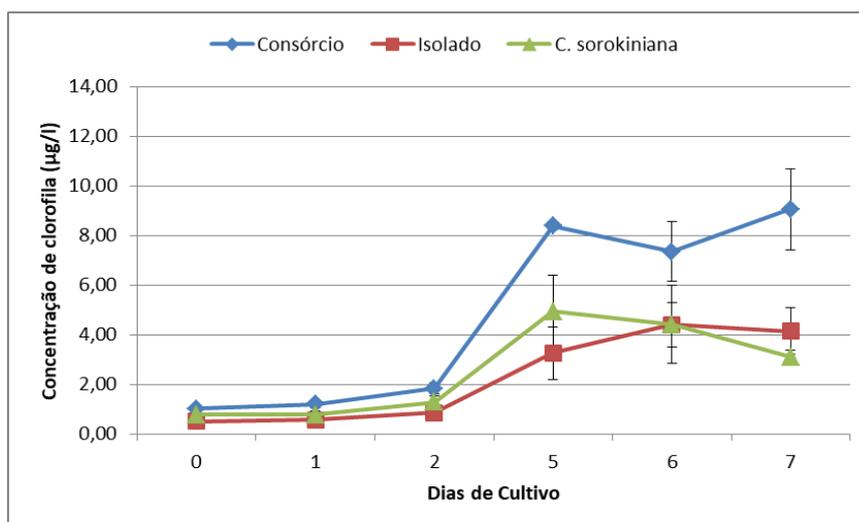
**Figura 21** – Peso seco inicial e final da Batelada 1 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.**Figura 22** – Peso seco inicial e final da Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.

Com relação à clorofila-a, na Batelada 1, os reatores inoculados com o Consórcio e com o Isolado e apresentaram concentrações finais de  $10,3 \pm 1,85$  e  $6,36 \pm 0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto os reatores inoculados com *C. sorokiniana* tiveram valor médio de  $4,49 \pm 0,43 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 23). Na Batelada 2, os valores finais de concentração de clorofila-a foram:  $9,07 \pm 1,63 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Consórcio),  $4,15 \pm 0,94 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Isolado), e  $3,11 \pm 0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$  (*C. sorokiniana*) (Figura 24).

**Figura 23** - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 1 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.

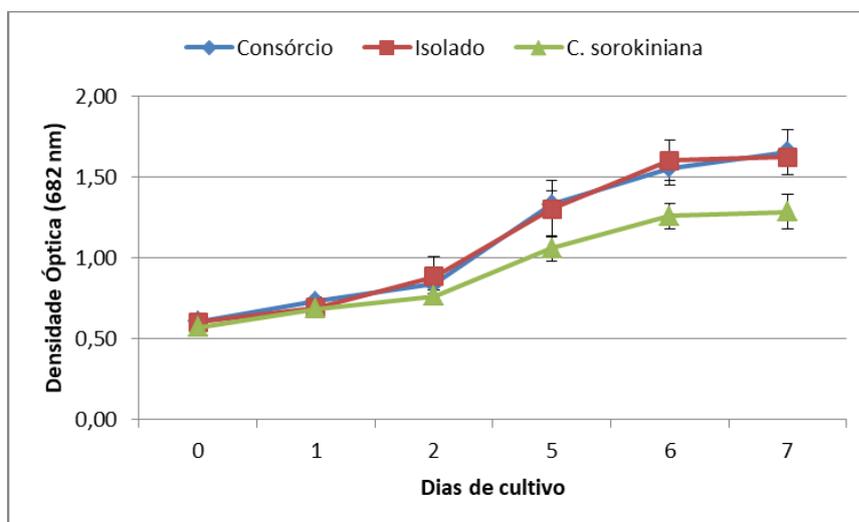


**Figura 24** - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.

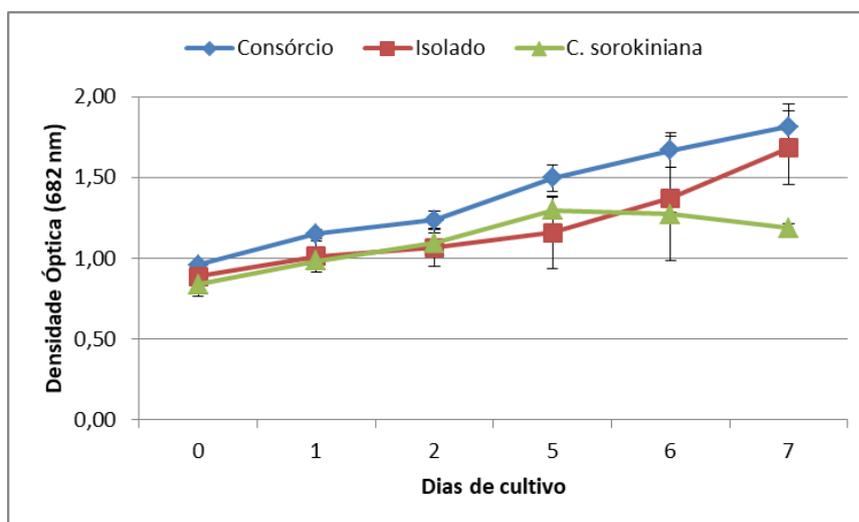


Em relação à  $DO_{682}$ , na Batelada 1, os reatores inoculados com o Consórcio e com o Isolado apresentaram valores de  $1,65 \pm 0,14$  nm e  $1,62 \pm 0,05$  nm, respectivamente, sendo significativamente maiores em relação aos reatores inoculados com *C. sorokiniana*, com valor de  $1,28 \pm 0,11$  nm (Figura 25). Na Batelada 2, a  $DO_{682}$  apresentou o mesmo padrão que na batelada anterior:  $1,82 \pm 0,10$  nm (Consórcio),  $1,68 \pm 0,23$  (Isolado) e  $1,19 \pm 0,02$  (*C. sorokiniana*) (Figura 26).

**Figura 25-** Densidade óptica (682 nm) na Batelada 1 da Etapa III sem CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



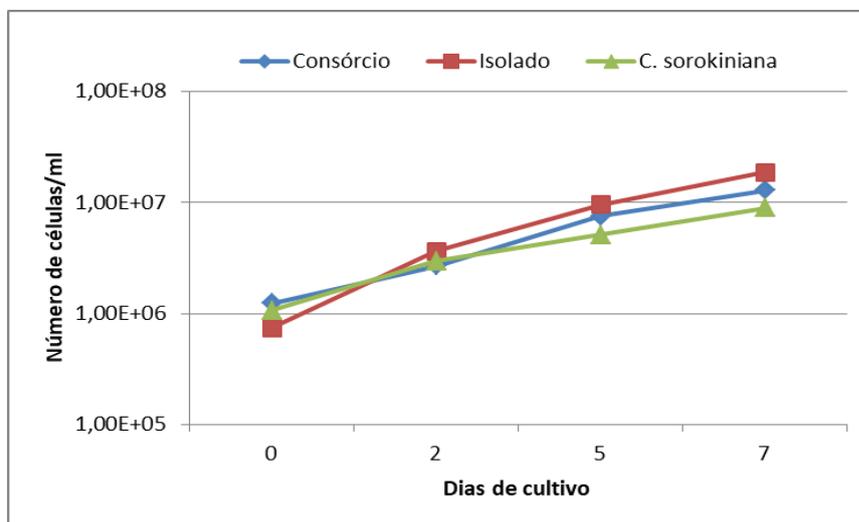
**Figura 26 -** Densidade óptica (682 nm) na Batelada 2 da Etapa III sem CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



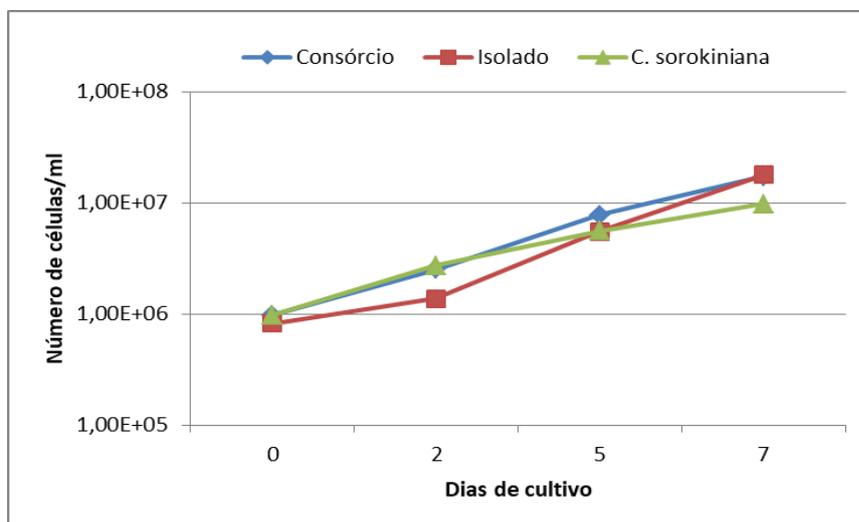
Os dados de contagem de células da Batelada 1 indicaram que os reatores inoculados com o Consórcio e o Isolado tiveram maior crescimento de microalgas, chegando a  $1,2 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> e  $1,8 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Nos reatores inoculados com *C. sorokiniana* a contagem resultou em  $8,9 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup> (Figura 27). Na Batelada 2, os reatores inoculados com o Consórcio, o Isolado e *C. sorokiniana*

apresentaram os seguintes resultados, respectivamente:  $1,7 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>,  $1,7 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> e  $9,7 \times 10^6$  cél.ml<sup>-1</sup> (Figura 28).

**Figura 27** - Número de células por mililitro na Batelada 1 da Etapa III sem CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



**Figura 28** - Número de células por mililitro na Batelada 2 da Etapa III sem CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



Com base na contagem do número de células (Figuras 27 e 28) foi calculada a taxa de crescimento durante os sete dias de cultivo e de crescimento exponencial. Para a Batelada 1, os resultados foram: 0,33 e 0,31 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para o Consórcio, 0,46 e 0,49 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para o Isolado, e 0,30 e 0,28 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para a *C. sorokiniana*. Para a Batelada 2, as taxas de crescimento geral e exponencial foram: 0,41 e 0,40 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>

(Consórcio), 0,43 e 0,44 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (Isolado) e 0,32 e 0,31 cél.ml<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (*C. sorokiniana*).

O crescimento das microalgas demonstrado nas análises de peso seco, clorofila-a, densidade óptica e contagem de células refletiu na remoção de nutrientes nitrogenados e fosfatados presentes na água negra tratada anaerobicamente. De acordo com os dados da Figura 29, a remoção de nitrogênio amoniacal na Batelada 1 apresentou comportamento semelhante nos três inóculos (Figura 29), porém, a maior remoção ocorreu nos reatores inoculados com Isolado. Nesses reatores, a remoção de nitrogênio amoniacal foi de 88% (de 271,52 ±2,14 chegando a 32,22 ±4,54 mg.L<sup>-1</sup> no sétimo dia), o que equivale a uma taxa de remoção de 34,18 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Para os reatores inoculados com o Consórcio de microalgas a remoção foi de 81% (de 275,03 ±0,82 no primeiro dia para 58,74 ±11,62 mg.L<sup>-1</sup> no sétimo dia), com taxa de remoção de 30,89 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Já para os reatores inoculados com *C. sorokiniana* a remoção foi de 80% (de 271,39 ±8,93 para 53,32 ±13,49 mg.L<sup>-1</sup>), sendo a taxa de remoção 31,15 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. A remoção para todos os reatores não apresentou diferença significativa (P ≤ 0,05).

A Batelada 2, seguiu a mesma tendência que a Batelada 1 (Figura 30). Nos reatores inoculados com o Consórcio a remoção foi de 98% a uma taxa de 29,78 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (concentrações iniciais e finais de 210,82 ±1,52 e 2,38 ±1,46 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Nos reatores inoculados com Isolado a remoção foi de 99% a uma taxa de 31,70 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (concentrações iniciais e finais de 222,98 ±0,82 e 1,06 ±1,50 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Em relação aos reatores inoculados com *C. sorokiniana* os valores foram: 87% (remoção), 24,16 mg.L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (taxa de remoção), 210,14 ±12,93 mg.L<sup>-1</sup> (concentração inicial) e 41,03 ±13,00 mg.L<sup>-1</sup> (concentração final). Não houve

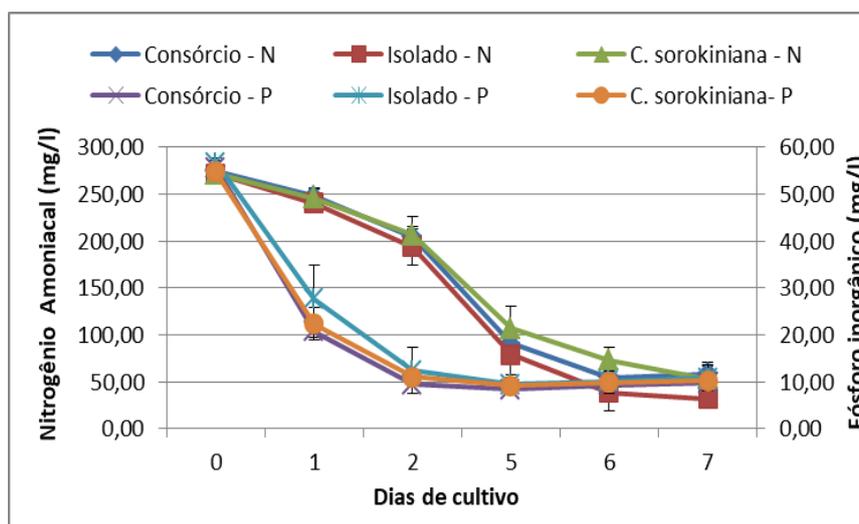
diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) de remoção de nitrogênio amoniacal entre os reatores na Batelada 2.

A metodologia de análise de nitrato e nitrito identifica as duas formas juntas, por isso os valores apresentados indicam a concentração de nitrato somado ao nitrito. No início do cultivo das duas bateladas não identificou concentração destes, apenas no final dos cultivos. Na Batelada 1 os reatores inoculados com Consórcio apresentaram concentração de  $4,69 \pm 2,51 \text{ mg.L}^{-1}$ , os reatores com Isolado  $55,81 \pm 7,21 \text{ mg.L}^{-1}$  e os reatores com *C. sorokiniana*,  $55,37 \pm 4,37 \text{ mg.L}^{-1}$ . Na Batelada 2, as concentrações finais foram  $50,85 \pm 6,41 \text{ mg.L}^{-1}$  nos reatores inoculados com Consórcio,  $23,10 \pm 11,42 \text{ mg.L}^{-1}$  nos reatores com Isolado e  $6,25 \pm 6,35 \text{ mg.L}^{-1}$  nos reatores com *C. sorokiniana*.

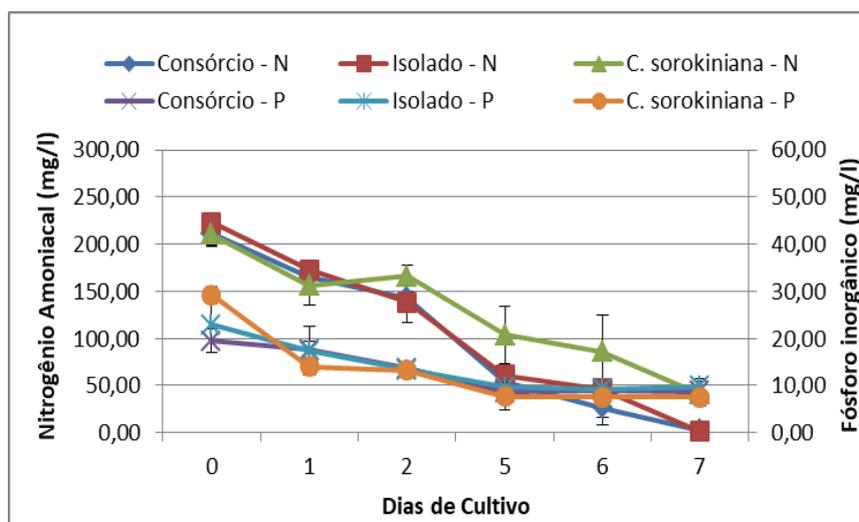
A tendência de remoção de fósforo inorgânico também foi semelhante entre as duas bateladas analisadas, com grande remoção nos primeiro cinco dias de cultivo e praticamente sem remoção nos dois dias finais. De acordo com os dados apresentados na Figura 29 (Batelada 1), os reatores inoculados com o Consórcio apresentaram remoção de 82%, taxa de remoção de  $9,45 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  até o quinto dia e  $6,56 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias, concentração inicial de  $55,67 \pm 2,08 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração final de  $9,70 \pm 1,64 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os reatores inoculados com Isolado apresentaram remoção de 81%, taxa de remoção de  $9,45$  até o quinto dia e  $6,54 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias, concentração inicial de  $56,67 \pm 0,57 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração final de  $10,83 \pm 2,75 \text{ mg.L}^{-1}$ . Os reatores inoculados com o *C. sorokiniana* apresentaram remoção de 81%, taxa de remoção de  $9,10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  até o quinto dia e  $6,33 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias, concentração inicial de  $56,67 \pm 1,15 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração final de  $10,30 \pm 0,60 \text{ mg.L}^{-1}$ . De acordo com esses dados, o tipo de inóculo não causou diferença significativa na remoção de fósforo inorgânico nos cultivos sem  $\text{CO}_2$ .

A Figura 30 apresenta os dados de concentração de fósforo inorgânico determinados durante a Batelada 2. Nos reatores inoculados com o Consórcio, a concentração inicial foi de  $26,30 \pm 0,88 \text{ mg.L}^{-1}$  e a concentração final foi de  $8,77 \pm 0,41 \text{ mg.L}^{-1}$  com 66% de remoção a uma taxa de remoção de  $2,50 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias e  $3,52 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  até o quinto dia. Nos reatores inoculados com Isolado, a concentração inicial foi de  $27,10 \pm 1,21 \text{ mg.L}^{-1}$  e a concentração final foi de  $9,83 \pm 1,50 \text{ mg.L}^{-1}$  com 64% de remoção a uma taxa de remoção de  $2,47 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias e  $3,48 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  até o quinto dia. Nos reatores inoculados com *C. sorokiniana*, a concentração inicial foi de  $29,27 \pm 1,85 \text{ mg.L}^{-1}$  e a concentração final foi de  $7,57 \pm 0,72 \text{ mg.L}^{-1}$  com remoção de 74% a uma taxa de  $3,10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  nos sete dias e  $4,32 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  até o quinto dia. A remoção de fósforo inorgânico foi significativamente maior nos reatores inoculados com o Consórcio e com o Isolado em relação aos reatores inoculados com *C. sorokiniana*.

**Figura 29** – Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 1 sem  $\text{CO}_2$  da etapa III.



**Figura 30** - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.



### 5.3.2. BATELADAS DE CULTIVO COM CO<sub>2</sub>

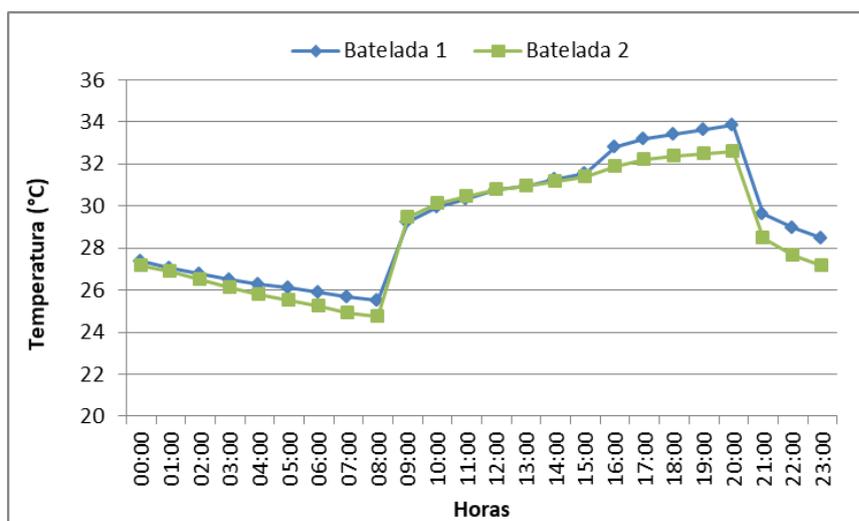
Os dados de monitoramento de temperatura mínima e máxima registradas durante os dias de cultivo e a temperatura média calculada das duas bateladas com CO<sub>2</sub> encontram-se na Tabela 5. Na Batelada 1 as temperaturas mínima, média e máxima foram de 25,5, 35,1 e 32,1°C, respectivamente. Na Batelada 2, estas foram de 24,3, 34,3 e 29,6°C, respectivamente.

Na Figura 31 encontra-se a variação de temperatura de hora em hora em um dia típico durante as Bateladas 1 e 2. Semelhante às Bateladas sem CO<sub>2</sub>, nas duas Bateladas com CO<sub>2</sub> aumento e queda da temperatura representam o horário em que as lâmpadas eram ligadas e desligadas.

**Tabela 4** - Temperaturas máxima, mínima e média nas bateladas 1 e 2 com CO<sub>2</sub> durante a etapa III.

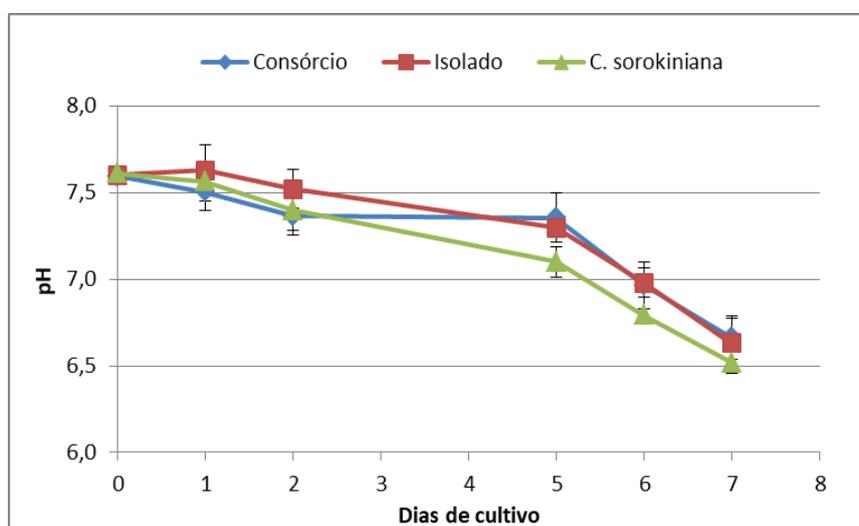
Temperatura	BATELADA 1	BATELADA 2
MÍNIMA	25,5 °C	24,3 °C
MÁXIMA	35,1 °C	34,3 °C
MÉDIA	32,1 °C ±1,8	29,6 °C ±0,74

**Figura 31** - Temperatura de hora em hora durante o segundo dia de cultivo na Batelada 1 e durante o quarto dia de cultivo da Batelada 2 com CO<sub>2</sub> durante a Etapa III.

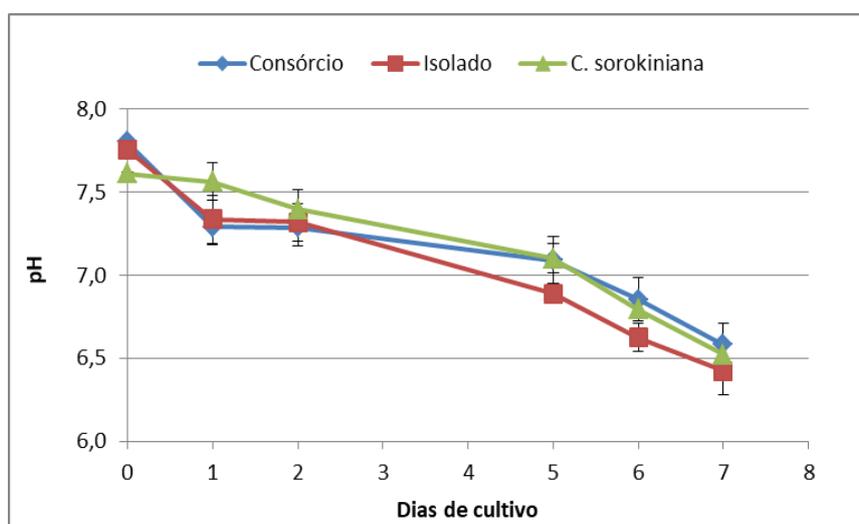


Ao contrário do ocorrido com o cultivo sem CO<sub>2</sub> (Figuras 32 e 33), os valores de pH das duas bateladas com cultivo com CO<sub>2</sub> diminuíram ao longo dos sete dias de cultivo. Na Batelada 1, os valores finais de pH dos reatores inoculados com Consórcio, Isolado e *C. sorokiniana* chegaram a  $6,6 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$  e  $6,5 \pm 0,0$  respectivamente (Figura 32). Na Batelada 2, os valores de pH foram de  $6,6 \pm 0,0$ ,  $6,4 \pm 0,0$ ,  $6,8 \pm 0,0$  e  $6,6 \pm 0,2$  para os reatores inoculados com Consórcio, Isolado e *C. sorokiniana* respectivamente (Figura 33).

**Figura 32** - pH da Batelada 1 com CO<sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo.

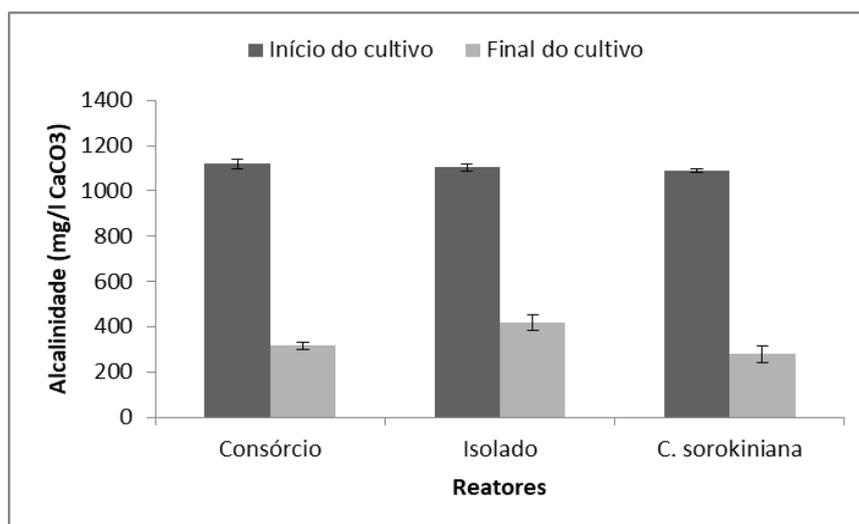


**Figura 33** - pH da Batelada 2 com CO<sub>2</sub> da Etapa III durante os sete dias de cultivo.

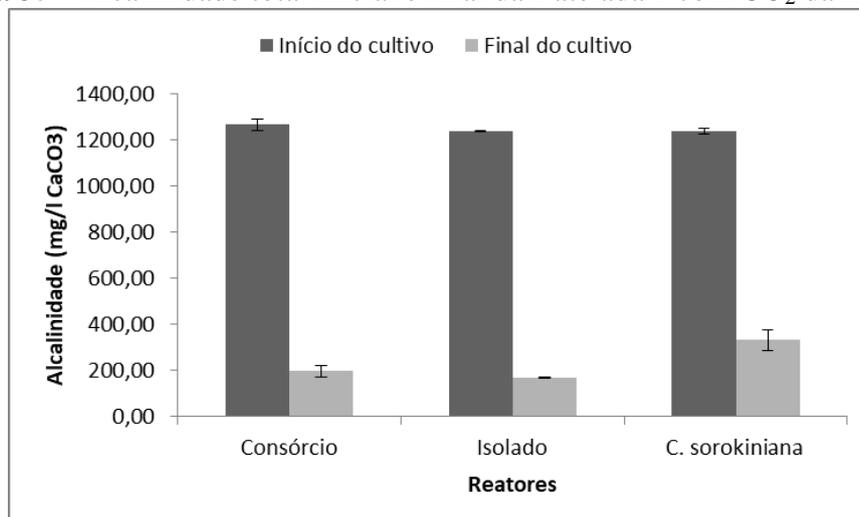


Nas figuras 34 e 35 encontram-se os valores iniciais e finais de alcalinidade nas Bateladas 1 e 2, respectivamente. Na Batelada 1, os valores de alcalinidade no início e final do cultivo nos reatores inoculados com o Consórcio foram, respectivamente,  $1.119,01 \pm 22,29$  e  $315,58 \pm 14,71$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , com o Isolado  $1.103,98 \pm 17,10$  e  $419,62 \pm 34,33$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , e com a *C. sorokiniana*  $1.090,11 \pm 7,21$  e  $279,75 \pm 37,08$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ . Na Batelada 2, os valores de alcalinidade no início e no final do cultivo, respectivamente, foram  $1.264,66 \pm 23,09$  e  $196,20 \pm 25,68$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  (Consórcio),  $1.238,08 \pm 3,47$  e  $169,00 \pm 1,83$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  (Isolado) e  $1.235,76 \pm 12,18$  e  $331,06 \pm 44,43$   $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  (*C. sorokiniana*).

**Figura 34** - Alcalinidade total inicial e final da Batelada 1 com  $\text{CO}_2$  da Etapa III.

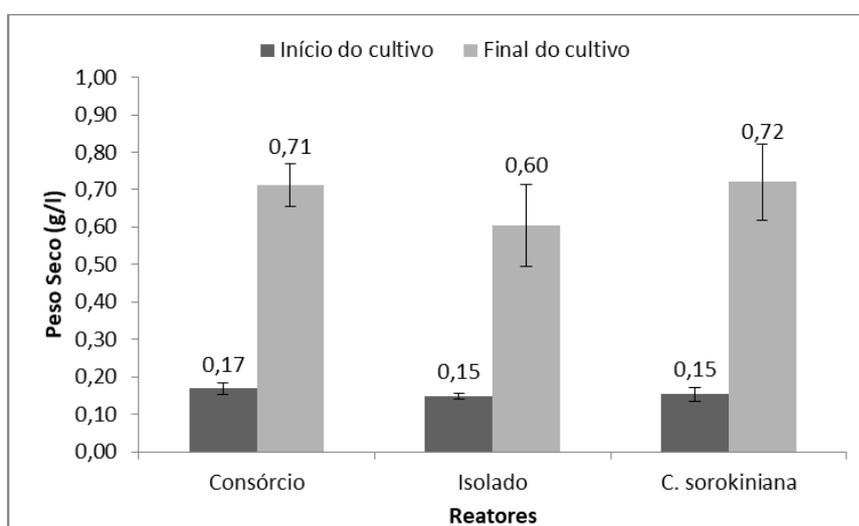


**Figura 35** - Alcalinidade total inicial e final da Batelada 2 com  $\text{CO}_2$  da Etapa III.

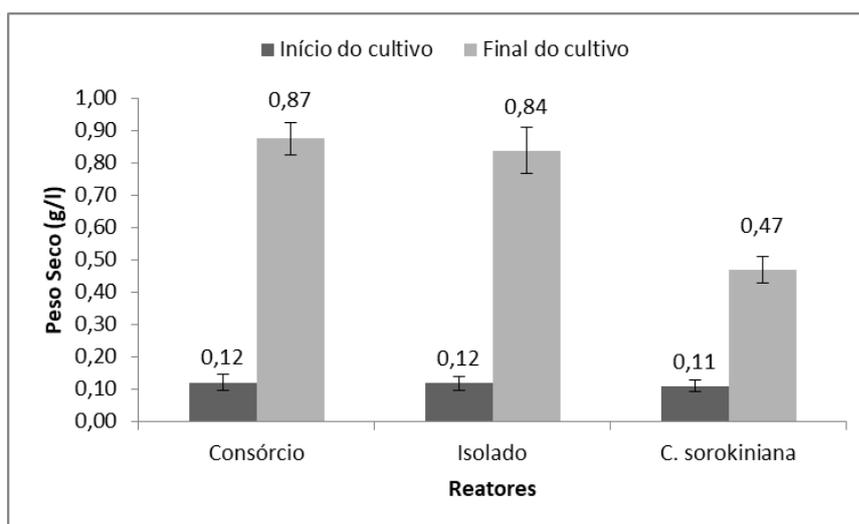


No que diz respeito às medidas de crescimento das microalgas, observa-se que na Batelada 1, os valores de peso seco nos reatores inoculados com o Consórcio, o Isolado e *C. sorokiniana* atingiram no último dia  $0,71 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $0,60 \pm 0,11 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,72 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 36). Na Batelada 2, os valores finais de peso seco foram:  $0,87 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$  (Consórcio),  $0,84 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$  (Isolado) e  $0,47 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$  (*C. sorokiniana*) (Figura 37).

**Figura 36** - Peso seco inicial e final da Batelada 1 com CO<sub>2</sub> da Etapa III.



**Figura 37** - Peso seco inicial e final da Batelada 2 com CO<sub>2</sub> da Etapa III.

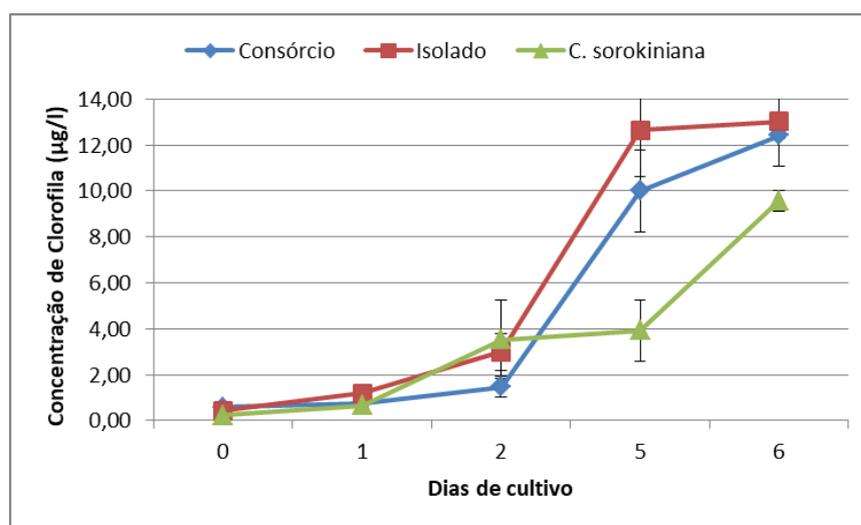


As Figuras 38 e 39 apresentam os dados de concentração de clorofila-a durante os cultivos com CO<sub>2</sub>. Na Batelada 1, a concentração máxima de clorofila foi

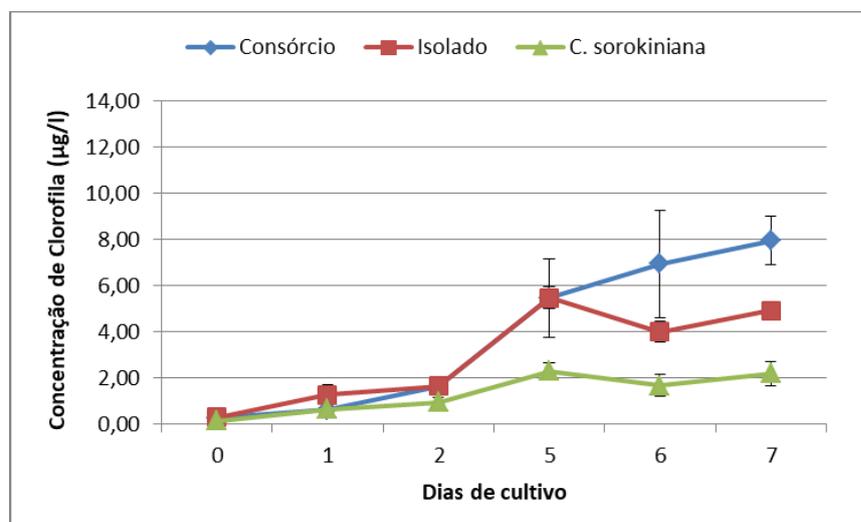
determinada no sexto dia de cultivo em todos os tipos de reatores, sendo que, no reatores inoculados com o Isolado apresentaram concentração de  $13,03 \pm 1,96 \mu\text{g.L}^{-1}$ , nos reatores inoculados com o Consórcio de  $12,43 \pm 0,17 \mu\text{g.L}^{-1}$  e nos reatores com *C. sorokiniana*,  $9,57 \pm 0,43 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Figura 38).

Na Batelada 2, a maior concentração de clorofila foi determinada nos reatores inoculados com o Consórcio no último dia de cultivo ( $7,94 \pm 1,04 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), seguido por um pico nos reatores inoculados com o Isolado no quinto dia de  $5,46 \pm 1,72 \mu\text{g.L}^{-1}$  e no último dia chegou a  $4,91 \pm 0,24 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Os reatores inoculados com *C. sorokiniana* apresentaram baixas concentrações de clorofila, atingindo  $2,19 \pm 0,54 \mu\text{g.L}^{-1}$  no último dia de cultivo.(Figura 39).

**Figura 38** - Concentração de clorofila até o sexto dia de cultivo da Batelada 1 com CO<sub>2</sub> da Etapa III.

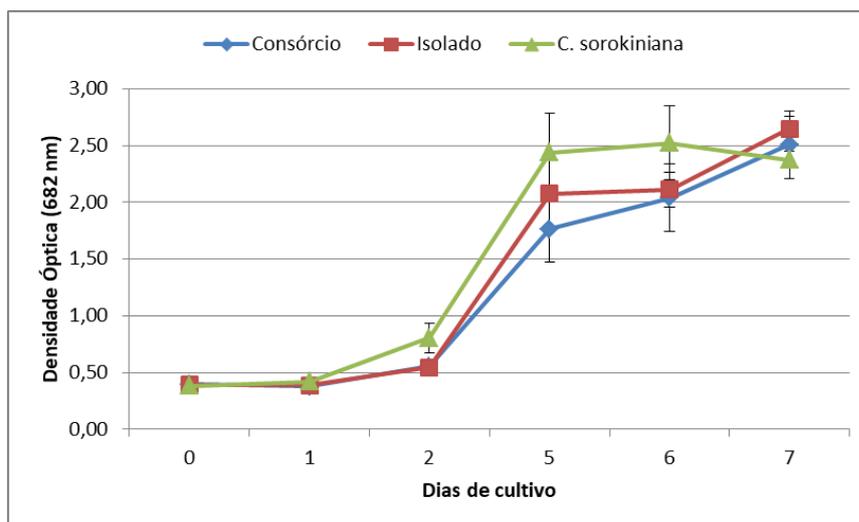


**Figura 39** - Concentração de clorofila durante os sete dias de cultivo da Batelada 2 com CO<sub>2</sub> da Etapa III.

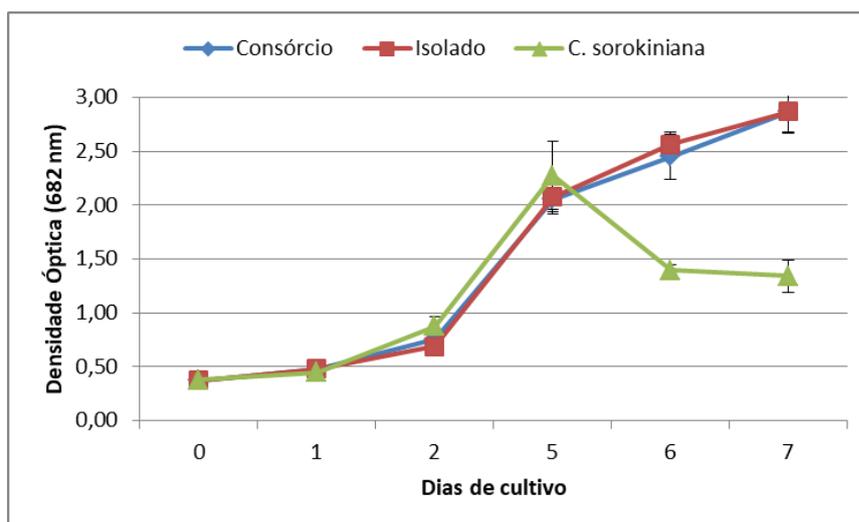


Na Batelada 1, a DO<sub>682</sub> manteve-se muito próxima nos três tipos de reatores do primeiro ao último dia de cultivo, apenas com os reatores inoculados com *C. sorokiniana* atingindo o valor máximo de  $2,52 \pm 0,33$  nm no sexto dia. Os outros dois reatores atingiram o valor máximo no último dia de cultivo:  $2,50 \pm 0,30$  nm (Consórcio) e  $2,67 \pm 0,11$  nm (Isolado) (Figura 40). Na Batelada 2, os reatores inoculados com o Consórcio e o Isolado seguiram a mesma tendência do início ao final do cultivo, os dois apresentando valores de DO<sub>682</sub> de  $2,86$  nm no último dia. Os reatores inoculados com *C. sorokiniana* acompanharam a tendência de aumento da densidade óptica até o quinto dia, com valor máximo de  $1,90$  nm, diminuindo os valores no sexto e sétimo dias, sendo significativamente menor no último dia de cultivo (Figura 41).

**Figura 40** - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 1 da Etapa III com CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



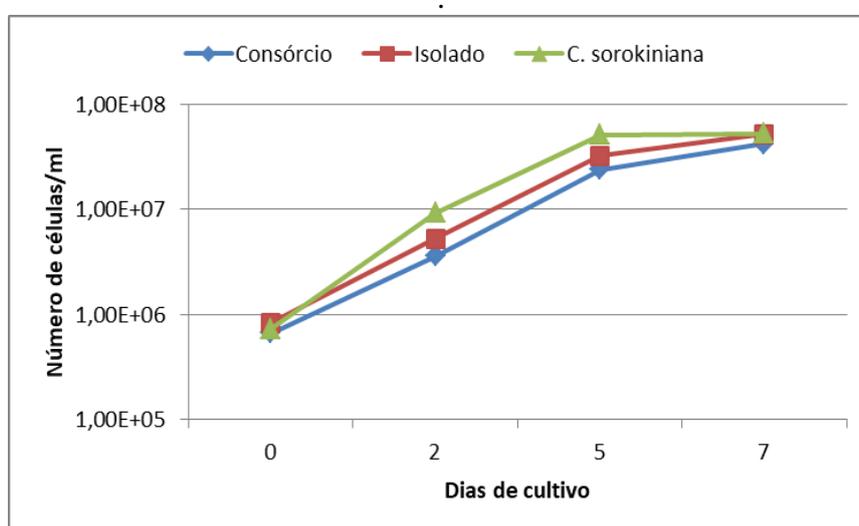
**Figura 41** - Densidade óptica (682 nm) na Batelada 2 da Etapa III com CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



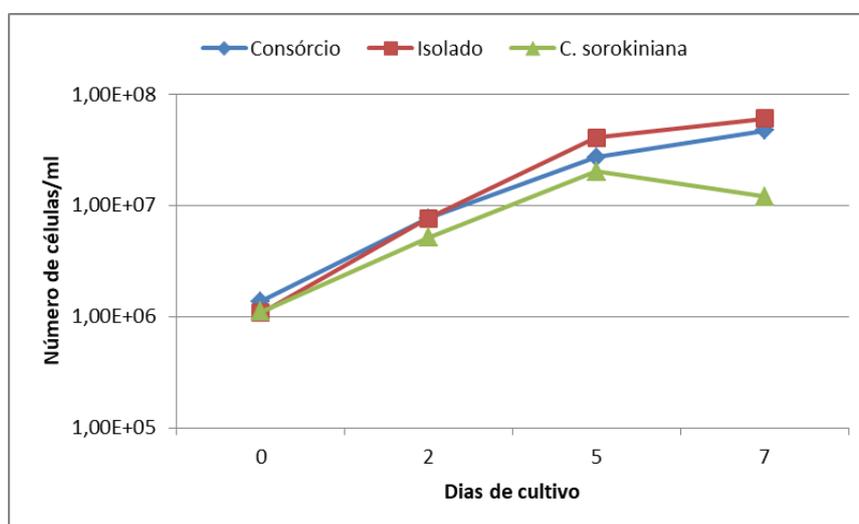
Os resultados de contagem celular estão apresentados nas Figuras 42 e 43. Na Batelada 1, todos os reatores chegaram a  $10^7$  no quinto dia de cultivo, sendo que o crescimento exponencial pode ser observado do primeiro até o quinto dia. No último dia de cultivo, os reatores inoculados com o Consórcio, o Isolado e *C. sorokiniana* apresentaram número de células de  $4,1 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>,  $5,2 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> e  $5,2 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 42). Na Batelada 2, o aumento no número de células também

foi mais acentuado do primeiro ao quinto dia, assim como na Batelada 1. Contudo, após este dia, uma diferenciação ocorreu entre os diferentes tipos de reatores. Aqueles inoculados com o Consórcio e o Isolado continuaram crescendo até o sétimo dia, atingindo contagens de  $4,7 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> e  $6,0 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, os reatores inoculados com *C. sorokiniana* tiveram uma redução no número de células do quinto para o sétimo dia (de  $2,0 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup> para  $1,2 \times 10^7$  cél.ml<sup>-1</sup>) (Figura 43).

**Figura 42** - Número de células por mililitro na Batelada 1 da Etapa III com CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo



**Figura 43** - Número de células por mililitro na Batelada 2 da Etapa III com CO<sub>2</sub> durante os sete dias de cultivo.



Em relação à remoção de nitrogênio amoniacal, na Batelada 1 (Figura 44), os reatores inoculados com *C. sorokiniana* apresentaram remoção de 71% (concentração inicial de  $212,42 \pm 2,82 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração final de  $60,74 \pm 6,54 \text{ mg.L}^{-1}$ ), o que corresponde a uma taxa de remoção de  $21,66 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Os reatores inoculados com o Isolado apresentaram 61% de remoção (concentração inicial de  $213,33 \pm 3,13 \text{ mg.L}^{-1}$  e concentração final de  $76,71 \pm 11,96 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a uma taxa de  $19,10 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Os reatores inoculados com o Consórcio removeram 61% de nitrogênio amoniacal (concentração inicial e concentração final de  $78,49 \pm 16,71 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a uma taxa de  $18,50 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  com. Não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as remoções de nitrogênio amoniacal dos reatores.

Na Batelada 2 (Figura 45), as porcentagens de remoção de nitrogênio amoniacal nos reatores inoculados com o Consórcio, o Isolado e a *C. sorokiniana* foram de 80% (concentração inicial de  $248,04 \pm 2,78 \text{ mg.L}^{-1}$  e final de  $48,62 \pm 1,62 \text{ mg.L}^{-1}$ ), 81% (concentração inicial de  $242,98 \pm 2,34 \text{ mg.L}^{-1}$  e final de  $43,79 \pm 3,50 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 71% (concentração inicial de  $238,53 \pm 3,65 \text{ mg.L}^{-1}$  e final de  $71,44 \pm 8,73 \text{ mg.L}^{-1}$ ). As taxas de remoção para os diferentes reatores foram:  $28,48 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Consórcio),  $28,45 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Isolado) e  $23,87 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (*C. sorokiniana*). Não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as remoções.

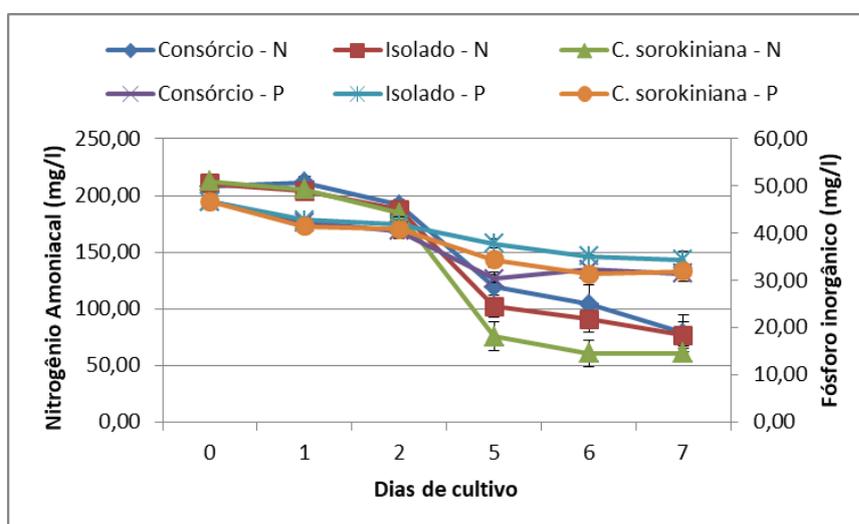
Na Figura 44, são apresentados os dados de concentração de fósforo inorgânico determinados durante a Batelada 1. Os resultados indicam que a remoção desse nutriente ocorreu de forma similar em todos os reatores, sendo que os reatores inoculados com o Consórcio apresentaram porcentagem de remoção de 32% (de  $46,67 \pm 0,76$  para  $31,50 \pm 1,80 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a uma taxa de  $2,16 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Os reatores inoculados com o Isolado apresentaram porcentagem de remoção de 26% (de  $46,67 \pm 0,29$  para  $34,33 \pm 1,76 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com taxa de  $1,76 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Já os reatores inoculados com *C.*

*sorokiniana* atingiram 31% de remoção (de  $46,67 \pm 1,04$  para  $32,00 \pm 0,87$   $\text{mg.L}^{-1}$ ), a uma taxa de  $2,09$   $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Não houve diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre as remoções de fósforo inorgânico dos reatores.

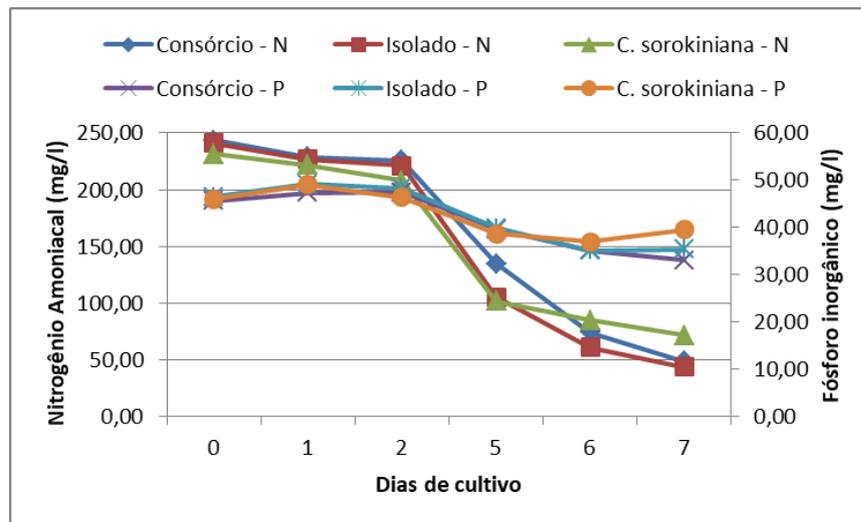
Na Batelada 2 (Figura 45), as porcentagens de remoção de fósforo inorgânico foram de 27% (de  $45,67 \pm 1,04$  para  $33,00 \pm 2,78$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores inoculados com o Consórcio, 24% (de  $46,50 \pm 0,50$  para  $35,33 \pm 0,29$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores inoculados com o Isolado, e 14% (de  $46,00 \pm 0,0$  para  $39,50 \pm 0,50$   $\text{mg.L}^{-1}$ ) nos reatores inoculados com *C. sorokiniana*. As taxas de remoção para os diferentes reatores foram:  $1,80$   $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Consórcio),  $1,59$   $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (Isolado) e  $0,92$   $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  (*C. sorokiniana*).

A análise de nitrato + nitrito no primeiro dia de cultivo não apresentou leitura no espectrofotômetro nas duas Bateladas, igualmente às bateladas sem  $\text{CO}_2$ . No último dia da Batelada 1, os reatores apresentaram as seguintes concentrações:  $133,94 \pm 23,58$   $\text{mg.L}^{-1}$  (Consórcio),  $142,95 \pm 23,34$   $\text{mg.L}^{-1}$  (Isolado) e  $155,99 \pm 11,44$   $\text{mg.L}^{-1}$  (*C. sorokiniana*). Na Batelada 2, a concentração do reator com Consórcio foi  $127,24 \pm 11,01$   $\text{mg.L}^{-1}$ , do reator com Isolado  $129,20 \pm 2,61$   $\text{mg.L}^{-1}$  e do reator com *C. sorokiniana*  $109,11 \pm 7,30$   $\text{mg.L}^{-1}$ .

**Figura 44** - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 1 com  $\text{CO}_2$  da Etapa III.



**Figura 45** - Nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico durante os sete dias de cultivo na Batelada 2 com CO<sub>2</sub> da Etapa III.



### 5.3.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS DIFERENÇAS OBSERVADAS ENTRE OS CULTIVOS SEM CO<sub>2</sub> E COM CO<sub>2</sub>

A Tabela 5 apresenta um resumo dos resultados obtidos no último dia de cultivo de cada uma das bateladas realizadas durante a Etapa III do trabalho, incluindo os dados de cultivo sem CO<sub>2</sub> (apresentados no item 5.3.1) e de cultivo com CO<sub>2</sub> (apresentados no item 5.3.2).

Os valores de pH nas bateladas sem CO<sub>2</sub> aumentou até o segundo dia de cultivo e manteve-se estável até o final deste. Este comportamento está relacionado com o crescimento das microalgas que ocorreu a partir do segundo dia de cultivo como observado nas análises de clorofila e densidade óptica. Apesar dos mecanismos de aumento do pH por meio da liberação de íon OH<sup>-</sup> discutidos no item 5.2, relativo à Etapa II, o crescimento das microalgas nas bateladas sem CO<sub>2</sub> causou a estabilização dos valores de pH. Isto ocorreu possivelmente devido ao consumo de íon amônio, o qual causa a liberação de H<sup>+</sup> no meio, fazendo com que o pH do sistema abaixe (RICHMOND; HU, 2013).

Nas bateladas com CO<sub>2</sub> observamos comportamento semelhante, o pH manteve-se com baixa queda até o quinto dia de cultivo, a partir do qual houve uma diminuição acentuada destes valores. O crescimento das microalgas e o consumo de nitrogênio amoniacal ocorreram apenas a partir do segundo dia de cultivo, após a fase de adaptação. O consumo de nitrogênio amoniacal neste período somado ao fornecimento de CO<sub>2</sub> ocasionou a diminuição nos valores de pH.

Nos resultados de alcalinidade total observamos uma diminuição desta em todos os reatores, nos cultivos sem e com CO<sub>2</sub>. A diminuição da alcalinidade ao longo do cultivo está relacionada ao consumo de carbono inorgânico pelas microalgas na forma de carbonatos e bicarbonatos presentes no meio. Isto indica que nos reatores nos

cultivos sem enriquecimento com  $\text{CO}_2$ , além do metabolismo heterotrófico, o metabolismo autotrófico também estava presente, visto que algumas microalgas conseguem utilizar o carbono inorgânico na forma de carbonatos e bicarbonatos (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014). Nos reatores com cultivo com  $\text{CO}_2$  também ocorreu a diminuição da alcalinidade total, indicando o consumo de carbono inorgânico igualmente.

**Tabela 5** – Resumo dos resultados do último dia de cultivo das bateladas com e sem CO<sub>2</sub> da Etapa III.

Reatores/ Parâmetros	BATELADAS SEM CO <sub>2</sub>						BATELADAS COM CO <sub>2</sub>					
	Batelada 1		Batelada 2		Batelada 1		Batelada 2		Batelada 1		Batelada 2	
	C	I	S	C	I	S	C	I	S	C	I	S
Peso Seco (g.L <sup>-1</sup> )	0,99 <sup>abc</sup>	0,82 <sup>bac</sup>	0,84 <sup>cab</sup>	0,99 <sup>d</sup>	0,64 <sup>e</sup>	0,85 <sup>f</sup>	0,71 <sup>ghi</sup>	0,60 <sup>hgi</sup>	0,72 <sup>igh</sup>	0,87 <sup>jk</sup>	0,84 <sup>kj</sup>	0,47 <sup>l</sup>
Clorofila a (µg.L <sup>-1</sup> )	10,39 <sup>ab</sup>	6,36 <sup>ba</sup>	4,49 <sup>c</sup>	9,07 <sup>d</sup>	4,15 <sup>ef</sup>	3,11 <sup>fe</sup>	*12,43 <sup>gh</sup>	*13,03 <sup>gh</sup> gi	*9,57 <sup>ih</sup>	7,94 <sup>jk</sup>	4,91 <sup>kj</sup>	2,19 <sup>l</sup>
DO <sub>682nm</sub>	1,65 <sup>ab</sup>	1,62 <sup>ba</sup>	1,28 <sup>c</sup>	1,82 <sup>de</sup>	1,68 <sup>cdf</sup>	1,19 <sup>ef</sup>	2,51 <sup>ghi</sup>	2,65 <sup>hg</sup>	2,37 <sup>ig</sup>	2,87 <sup>jk</sup>	2,87 <sup>kj</sup>	1,34 <sup>l</sup>
Número células.ml <sup>-1</sup>	1,28X1 07	1,86X1 07	8,91X1 06	1,72X1 07	1,79X1 07	9,77X1 06	4,19X107	5,20X1 07	5,22X1 07	4,71X1 07	6,03X1 07	1,20X1 07
Taxa de crescimento geral (d <sup>-1</sup> )	0,33	0,46	0,30	0,41	0,43	0,32	0,59	0,59	0,61	0,50	0,57	0,34
Remoção N Amoniacal (%)	81 <sup>abc</sup>	88 <sup>bac</sup>	80 <sup>cab</sup>	98 <sup>def</sup>	99 <sup>edf</sup>	86 <sup>fde</sup>	62 <sup>ghi</sup>	63 <sup>hg</sup>	71 <sup>ig</sup>	80 <sup>jk</sup>	81 <sup>kj</sup>	68 <sup>lk</sup>
Taxa de remoção N amoniacal	30,89	34,18	31,15	29,78	31,70	24,16	18,50	19,10	21,66	27,83	28,15	22,84
Remoção N Inorgânico (%)**	81	78	79	74	89	83	0	0	0	27	28	21
Remoção Fósforo inorgânico (%)	82 <sup>abc</sup>	81 <sup>bac</sup>	81 <sup>cab</sup>	66 <sup>def</sup>	63 <sup>edf</sup>	74 <sup>fde</sup>	32 <sup>ghi</sup>	26 <sup>hgi</sup>	31 <sup>igh</sup>	27 <sup>jk</sup>	24 <sup>kj</sup>	14 <sup>l</sup>
Taxa de remoção F inorgânico	6,56	6,54	6,33	2,50	2,47	3,10	2,16	1,76	2,09	1,80	1,59	0,92

\*Valor referente ao sexto dia de cultivo; \*\*Valor calculado de remoção considerando o nitrogênio amoniacal oxidado a nitrito e nitrato. \*\*\*As letras C, I e S, indicam os reatores inoculados com o Consórcio, com o Isolado e com a *Chlorella sorokiniana*, respectivamente; \*\*\*\*As letras de A a L indicam semelhança estatística ( $P \leq 0,05$ ) entre as médias.

Com relação às medidas de crescimento das microalgas, o peso seco apresentou valores semelhantes nas bateladas com e sem CO<sub>2</sub>, sendo que o valor máximo de peso seco obtido de 0,99 g.L<sup>-1</sup> ocorreu nos reatores inoculados com Consórcio nas bateladas sem CO<sub>2</sub> e o mínimo de 0,47 g.L<sup>-1</sup> nos reatores inoculados com *C. sorokiniana* na batelada 2 com CO<sub>2</sub>. O peso seco funciona como uma medida indireta do crescimento das microalgas, já que junto com estas ficam retidos na membrana sólidos presentes no efluente e outros microrganismos existentes, isto pode ocasionar diferenças em relação às análises de clorofila e densidade óptica.

Em um estudo comparando cultivos aerados a 0,2 vvm com ar atmosférico, ar enriquecido com 5 e 10% de CO<sub>2</sub>, Yao, Shi e Miao (2015) cultivaram *C. sorokiniana* em efluente de tratamento secundário acrescido de efluente suíno em diferentes concentrações em Erlenmeyer de 1 L com 600 mL de volume, 28 ±2°C, 126 μmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa e fotoperíodo de 12/12 horas por 10 dias. Na concentração de nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico próximas a este trabalho (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 199,96 mg.L<sup>-1</sup>; P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> = 30,87 mg.L<sup>-1</sup>), o crescimento da microalga foi baixo na aeração apenas com ar atmosférico no efluente, chegando a biomassa de 0,13 g.L<sup>-1</sup>. Comparativamente, o presente trabalho obteve melhores resultados de crescimento da *C. sorokiniana* nas mesmas condições de aeração, com 0,85 g.L<sup>-1</sup> na Batelada 2 sem CO<sub>2</sub>. Na aeração com 5% CO<sub>2</sub>, os autores obtiveram o melhor resultado de crescimento de 1,31 g.L<sup>-1</sup>. Na aeração com 10% de CO<sub>2</sub>, concentração mais próxima a este trabalho considerando a quantidade total de ar por volume de cultivo (vvm), o crescimento diminuiu (1,16 g.L<sup>-1</sup>), mas ainda manteve-se acima da biomassa da *C. sorokiniana* na Batelada 1 com CO<sub>2</sub> encontrada neste trabalho (0,72 g.L<sup>-1</sup>).

Na análise de clorofila-a, os reatores inoculados com *C. sorokiniana* apresentaram concentrações significativamente menores em relação aos outros reatores nas bateladas heterotróficas e mixotróficas. Nas quatro bateladas realizadas o aumento da clorofila-a ocorreu a partir do segundo dia de cultivo, indicando uma fase de adaptação (lag) das microalgas nos dias iniciais. As maiores concentrações de clorofila-a foram encontradas na Batelada 1 com CO<sub>2</sub> no sexto dia de cultivo.

Em relação à densidade óptica, o comprimento de onda 682 no qual ocorre a máxima absorção de clorofila-a, nas quatro bateladas, assim como na análise de clorofila-a, foi observado o crescimento a partir do segundo dia de cultivo. Nas bateladas com CO<sub>2</sub> a DO<sub>682</sub> apresentou valores maiores em relação às bateladas sem CO<sub>2</sub>, exceto no reator inoculado com *C. sorokiniana* na Batelada 2 com CO<sub>2</sub>. Semelhante aos valores de DO<sub>682</sub> encontrados no presente trabalho nas bateladas heterotróficas, Bohutskyi et al. (2015) cultivaram a *C. sorokiniana* e uma microalga isolada de uma estação de tratamento de esgoto municipal no efluente secundário desta estação com adição de lodo em reatores de 450 ml sem aeração, iluminação de 150  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 14/10 horas claro/escuro durante 10 dias. Os valores de DO<sub>680</sub> obtidos por estes autores foram de 0,90 nm para a microalga isolada, menor em relação aos resultados dos cultivos sem CO<sub>2</sub> deste trabalho e 1,20 nm para a *C. sorokiniana*, este semelhante aos valores obtidos nos reatores inoculados com *C. sorokiniana* nos cultivos sem CO<sub>2</sub>.

A contagem do número de células nas bateladas sem CO<sub>2</sub> apresentou resultado semelhante nos reatores inoculados com Consórcio e com Isolado, mas valores menores nos reatores inoculados com *C. sorokiniana*, semelhante à tendência de outras análises. Na batelada 1 com CO<sub>2</sub>, todos os reatores apresentaram crescimento semelhante e na

batelada 2, o reator inoculado com *C. sorokiniana* apresentou menor valor de número de células.

As taxas de crescimento, calculadas com base nos resultados de número de células, nas bateladas sem CO<sub>2</sub> a taxa de crescimento durante os 7 dias de cultivo variou de 0,30 d<sup>-1</sup> no reator inoculado com *C. sorokianiana*, a 0,46 d<sup>-1</sup>, no reator inoculado com Isolado. Estes valores são maiores aos encontrado por Tapia et al. (2018) (0,24 d<sup>-1</sup>) em condições semelhantes de crescimento. As taxas de crescimento na fase exponencial nestas bateladas variaram de 0,28 d<sup>-1</sup> nos reatores inoculados com *C. sorokiniana* a 0,49 d<sup>-1</sup> nos reatores inoculados com Isolado. Nas bateladas com CO<sub>2</sub> a taxa de crescimento geral (7 dias) variou de 0,34 a 0,61 d<sup>-1</sup>, nos reatores inoculados com *C. sorokiniana* nas Bateladas 1 e 2, respectivamente. Os reatores inoculados com o Consórcio e com o Isolado variaram de 0,50 a 0,59 d<sup>-1</sup>, sendo semelhantes. Porém, entre as bateladas com e sem CO<sub>2</sub>, as taxas de crescimento foram maiores nas bateladas com CO<sub>2</sub>.

Nas análises de medida de crescimento das microalgas houve algumas discrepâncias nos resultados em relação à comparação de uma análise com outras. Deve-se ressaltar que algumas análises estão sujeitas a erros próprios da metodologia e interferentes. A análise de número de células, apesar de ser uma contagem direta por meio de um microscópio, não considera o conteúdo celular das microalgas, podendo este ser maior ou menor, o que influenciaria nas medidas de densidade óptica e no conteúdo de clorofila por célula.

Na Batelada 1 com CO<sub>2</sub>, os reatores inoculados com *C. sorokiniana* apresentaram diferença significativa nas análises de DO<sub>682</sub> e de Clorofila, demonstrando menor crescimento em relação às outras. No entanto, nas análises de peso seco e número de células o crescimento foi semelhante e entre os reatores inoculados com o Consórcio e o Isolado não houve diferença significativa. Na Batelada 2 com CO<sub>2</sub> no

quinto dia de cultivo um reator inoculado com *C. sorokiniana* apresentou coloração amarelada e resultados visivelmente menores nas análises de crescimento. No sexto dia de cultivo os outros dois reatores com *C. sorokiniana* também apresentaram a mesma coloração amarelada indicando a morte das microalgas. No último dia de cultivo os reatores inoculados com Consórcio e com Isolado apresentaram crescimento semelhante, mas o reator com *C. sorokiniana* apresentou crescimento significativamente menor, inclusive em relação à primeira batelada com CO<sub>2</sub>. Nas análises foi possível confirmar isto devido à diminuição de todos os parâmetros de monitoramento. Os reatores com Consórcio e Isolado nas mesmas condições não apresentaram coloração amarelada e queda nos parâmetros, indicando que a *C. sorokiniana* sofreu algum tipo de estresse prejudicial ao seu crescimento.

Em relação ao nitrogênio, no início dos cultivos da Etapa III, a análise para nitrato e nitrito não apresentou leitura no espectrofotômetro em nenhuma das bateladas, sendo que o limite mínimo de detecção pelo método de Injeção de Fluxo com coluna de cádmio (APHA – 2012) é de 0,01 mg. L<sup>-1</sup>, mas este resultado condiz com a literatura, pois efluentes recém-coletados de reatores anaeróbios possuem baixos teores de nitrato e nitrito, sendo o nitrogênio amoniacal a forma predominante (VON SPERLING, 2007).

A remoção de nitrogênio amoniacal na Etapa III foi maior nas bateladas sem CO<sub>2</sub>, sendo a máxima de 98% no Consórcio da Batelada 2. No entanto, a concentração de nitrato-nitrito no último dia de cultivo deve ser avaliada em conjunto a estes resultados para afirmar-se a real remoção de nitrogênio amoniacal pelas microalgas, sendo que este pode ter sido oxidado a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e em seguida a nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) por bactérias nitrificantes (VAN HAANDEL; KATO; VON SPERLING, 2009). Assim, levando em conta o nitrogênio amoniacal oxidado, as reais remoções de nitrogênio inorgânico para os reatores inoculados com Consórcio, Isolado e *C. sorokiniana* foram,

respectivamente, 81, 53 e 54% na Batelada 1 sem CO<sub>2</sub>, havendo diferença significativa apenas entre os reatores com Consórcio e com *C. sorokiniana*. Na Batelada 2 sem CO<sub>2</sub> as remoções foram de 74, 86 e 76%. Entre os reatores com Consórcio e com *C. sorokiniana* não houve diferença significativa, mas entre o Isolado e estes houve, sendo que o Isolado apresentou maior remoção. Na Batelada 1 com CO<sub>2</sub> ocorreu 0% de remoção em todos os reatores e na Batelada 2 com CO<sub>2</sub> 27, 28 e 21% para o Consórcio, Isolado e *C. sorokiniana*, respectivamente, sem diferença significativa entre eles. Este resultado é semelhante ao encontrado na Etapa II deste trabalho (item 5.2), no qual as remoções de nitrogênio amoniacal variaram de 5 a 6% nas três bateladas.

Outra forma de remoção de nitrogênio amoniacal nos cultivos é por meio da volatilização da amônia que ocorre quando o pH do sistema é elevado e a forma de íon amônio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é transformado em NH<sub>3</sub> gasoso. Em pH 9,5, 50% encontra-se na forma de íon e 50% na forma de amônia (VON SPERLING, 2007). Alguns trabalhos já reportaram a volatilização da amônia como fator importante na remoção deste nutriente. Silva (2014) cultivando as microalgas *C. vulgaris* e *P. subcapitata* em meio OCDE simulando as concentrações de nitrogênio e fósforo de um esgoto doméstico em escala laboratorial, fotoperíodo de 24 horas e iluminação com lâmpadas fluorescentes (60 μmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) observou a remoção de 100% da amônia em 48 horas de cultivos. Porém, por meio de um teste, pode verificar que cerca de 44% da amônia havia sido perdida por volatilização devido ao aumento do pH e da temperatura que atingiram 9,7 e 27°C, respectivamente.

A maior remoção no reator com Consórcio (81%) em relação aos outros (53 e 54%) pode ser relativa à volatilização da amônia. Nas Bateladas sem CO<sub>2</sub> o pH dos cultivos foi elevado, mas apenas o Consórcio na Batelada 1 atingiu 9,2, enquanto os outros mantiveram-se abaixo de 9,0. Na Batelada 2, nenhum dos reatores atingiu valores

maiores que 9,0, sendo menor a possibilidade que tenha ocorrido a volatilização desta. Nas Bateladas com CO<sub>2</sub> o pH manteve-se abaixo de 8,0, portanto, com o nitrogênio amoniacal na forma predominante de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

O fósforo inorgânico é a principal forma de absorção de fósforo pelas microalgas, sendo considerado limitante para o seu crescimento quando em baixas concentrações. A remoção de fósforo inorgânico nas bateladas sem CO<sub>2</sub> atingiu altas porcentagens, sendo na faixa de 80% na Batelada 1 e entre 60 e 79% na Batelada 2. No entanto, nas Bateladas com CO<sub>2</sub> apresentou uma considerável diferença, com as remoções na faixa de 20 a 30% na Batelada 1 e 14 a 27% na Batelada 2.

Apesar das alterações realizadas entre as Etapas II e III de aumento da quantidade de luz, adaptação ao CO<sub>2</sub> e aumento do inóculo inicial, nos cultivos com CO<sub>2</sub> foram observadas baixas remoções de nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico nas duas bateladas com CO<sub>2</sub> em relação às bateladas sem CO<sub>2</sub>.

Embora o inóculo inicial de cultivo seja composto por uma microalga ou um consórcio de microalgas, esgotos possuem seu próprio conjunto de microrganismos, entre microalgas, bactérias e protozoários, sendo difícil manter uma monocultura após algum tempo de funcionamento do sistema. Neste trabalho o efluente não foi autoclavado para avaliar as condições naturais de crescimento das microalgas em conjunto com outros microrganismos. Por isso, as remoções de nutrientes e devem levar em consideração a presença destes.

Poucos trabalhos foram realizados sem enriquecimento com CO<sub>2</sub>, mas apresentam altas remoções de nitrogênio e fósforo quando o meio possui carbono orgânico, semelhante ao encontrado neste trabalho nas Bateladas sem CO<sub>2</sub>. Znad et al. (2018) cultivaram a microalga *C. vulgaris* em efluente de tratamento primário (NT = 30,6 mg.L<sup>-1</sup>; FT = 6,6 mg.L<sup>-1</sup>) de esgoto municipal filtrado e autoclavado em

fotobiorreatores com 250 ml de volume,  $180 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa, aerados com ar atmosférico filtrado ( $50 \text{ ml.min}^{-1}$ ) durante 13 dias. As remoções de nitrogênio total e fósforo total foram de 100 e 80%, respectivamente e a taxa máxima de crescimento da microalga de  $1,2 \text{ d}^{-1}$ , maior em relação a este trabalho ( $0,46 \text{ d}^{-1}$ ).

Muitos estudos com crescimento de microalgas utilizam aeração enriquecida com  $\text{CO}_2$  para fornecer carbono inorgânico e permitir um maior crescimento das microalgas pelo metabolismo autotrófico e maiores remoções de nutrientes. No entanto, neste trabalho, as remoções de nutrientes foram menores nas Bateladas com  $\text{CO}_2$  em relação às Bateladas sem  $\text{CO}_2$ , apesar de um maior crescimento das microalgas ter sido observado nas análises de  $\text{DO}_{682}$ , do número de células, da taxa de crescimento geral e exponencial e da clorofila para o Isolado B1 e a *C. sorokiniana* B1 nas Bateladas com  $\text{CO}_2$ , demonstrando que houve crescimento.

Com condições de cultivo semelhantes a este trabalho, com testes com e sem  $\text{CO}_2$ , Tapia et al. (2018) utilizaram efluente de reator anaeróbico ( $\text{DQO} = 334 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{N-NH}_4^+ = 626 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{P-PO}_4^{3-} = 9,23 \text{ mg.L}^{-1}$ ) de uma estação de tratamento de esgoto municipal para o crescimento de uma microalga isolada do efluente, identificada como *C. sorokiniana*. O cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer de 1 litro, a  $25^\circ\text{C}$ , iluminação artificial de  $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e aeração apenas com ar atmosférico, devido à presença de carbono orgânico no efluente. A remoção de fósforo inorgânico foi de 99% e de nitrogênio amoniacal, apenas 36% no mesmo período. A taxa de crescimento específico da microalga foi de  $0,24 \text{ d}^{-1}$ , menor em relação às taxas de crescimento do presente trabalho. Apesar da alta remoção de fósforo, esta ocorreu apenas após 26 dias de cultivo e a baixa remoção de nitrogênio amoniacal foi atribuída à limitação por fósforo inorgânico. O presente estudo encontrou melhores resultados de remoção de nitrogênio amoniacal e maior taxa de crescimento em condições similares nas Bateladas sem  $\text{CO}_2$ ,

possivelmente pela proporção mais adequada de nitrogênio e fósforo. Para verificar se a ausência de enriquecimento com CO<sub>2</sub> foi prejudicial ao cultivo, Tapia et al. (2018) realizaram outro experimento, desta vez com 5% de enriquecimento de CO<sub>2</sub> nas mesmas condições anteriores. Foram obtidos melhores resultado de crescimento, com um aumento 33% na biomassa produzida e de 6% na taxa de crescimento específico. A remoção de nutrientes não foi reportada para esta parte do estudo.

Em relação à remoção de nutrientes, Yao, Shi e Miao (2015) obtiveram remoção de 99, 97 e 87% de nitrogênio amoniacal nos cultivos com ar, 5 e 10% de CO<sub>2</sub>, respectivamente. Para o fósforo total as remoções foram de 80, 93 e 91% com ar, 5 e 10% de CO<sub>2</sub>, respectivamente. As altas remoções de fósforo encontradas nos experimentos apenas com ar são semelhantes aos valores encontrados neste trabalho na Batelada 1 sem CO<sub>2</sub> e maiores em relação às outras bateladas.. As remoções de nitrogênio amoniacal foram maiores no estudo destes autores em relação ao presente trabalho, mas foram associados pelos autores a volatilização da amônia devido aos valores de pH acima de 9,0. No entanto, as remoções nos cultivos enriquecidos com CO<sub>2</sub> são maiores em relação às encontradas nas Bateladas com CO<sub>2</sub>.

Outro estudo que apresenta melhores resultados em relação aos apresentados no presente estudo com enriquecimento com CO<sub>2</sub> foi realizado por Fernandes et al. (2015) que cultivaram a *C. sorokiniana* em água negra tratada por reator UASB com alta concentração de nutrientes (1,07 gNH<sub>4</sub><sup>+</sup>.L<sup>-1</sup>; 73 mgP.L<sup>-1</sup>), em um fotobiorreator flat-panel de 380 ml de volume e 14 mm de diâmetro, aeração com 10% de enriquecimento de CO<sub>2</sub> (40 ml.min<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> e 360 ml.min<sup>-1</sup> de ar) e 1,75 . 10<sup>5</sup> cel.ml<sup>-1</sup> de inóculo inicial, a 37°C, com iluminação inicial de 100 μmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> por 5 dias, seguida por 150 μmol.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> por mais 3 dias, totalizando 8 dias de cultivo. O fósforo inorgânico foi 100% removido com 6 dias de cultivo a uma taxa de 26 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, maior em relação a este

trabalho nas bateladas heterotróficas ( $9,45 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e mixotróficas ( $3,25 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). O nitrogênio amoniacal apresentou remoção de 76% até o sexto dia apenas, devido a depleção do fósforo inorgânico, mas esta remoção foi semelhante ao encontrado neste trabalho nas bateladas mixotróficas (61 a 82%). A biomassa atingiu  $9 \text{ g.L}^{-1}$  no oitavo dia, este alto crescimento comparado a este trabalho e a outros citados anteriormente pode estar relacionado ao pequeno volume de cultivo (380 ml) e ao fotobiorreator que possui um caminho de luz de 14 mm, o que permite a entrada de luz em todo o reator. No presente estudo, o diâmetro do fotobiorreator era de 13 cm, o que aumenta o caminho da luz, podendo ser esta a causa da baixa remoção de nutrientes encontrada nas Bateladas com  $\text{CO}_2$  se comparada ao encontrado por estes autores.

Nos resultados deste trabalho pode-se observar uma melhor remoção de nutrientes de fósforo inorgânico nos cultivos heterotróficos. As remoções de nitrogênio amoniacal foram semelhantes quando não consideradas as concentrações de nitrito e nitrato produzidas, mas ao considerar estas a remoção de nitrogênio amoniacal foi melhor nos cultivos sem  $\text{CO}_2$ . Apesar das baixas remoções nos cultivos com  $\text{CO}_2$  serem contrárias às reportadas na literatura, as melhores remoções nos cultivos sem enriquecimento de  $\text{CO}_2$  encontradas neste trabalho demonstram a capacidade de recuperação de nutrientes de água negra tratada anaerobicamente em cultivo sem  $\text{CO}_2$ , o que diminui os custos do cultivo, tornando-o mais simples.

Comparando o crescimento e eficiência de remoção de nutrientes entre os diferentes isolados, de forma geral nas Bateladas com  $\text{CO}_2$  pode ser observado um crescimento maior do Isolado e Consórcio em relação à *C. sorokiniana*. No entanto, nas remoções de nutrientes não houve diferença significativa entre os reatores.

Na Batelada 1 com  $\text{CO}_2$  a *C. sorokiniana* apresentou diferença significativa nas análises de  $\text{DO}_{682}$  e de Clorofila, demonstrando menor crescimento em relação às

outras. No entanto, nas análises de peso seco e número de células o crescimento foi semelhante e entre os reatores com Consórcio e Isolado não houve diferença significativa. Na Batelada 2 com CO<sub>2</sub> no quinto dia de cultivo um reator com *C. sorokiniana* apresentou coloração amarelada e resultados visivelmente menores nas análises. No sexto dia de cultivo os outros dois reatores com *C. sorokiniana* também apresentaram a mesma coloração amarelada indicando a morte das microalgas. No último dia de cultivo o Consórcio e o Isolado apresentaram crescimento semelhante, mas a *C. sorokiniana* apresentou crescimento significativamente menor, inclusive em relação à primeira batelada com CO<sub>2</sub>. Nas análises foi possível confirmar isto devido à diminuição de todos os parâmetros de monitoramento. Os reatores com Consórcio, Isolado nas mesmas condições não apresentaram coloração amarelada e queda nos parâmetros, indicando que a *C. sorokiniana* sofreu algum tipo de estresse prejudicial ao seu crescimento. Nestas bateladas não houve diferença entre as remoções de nutrientes entre os reatores.

Outros trabalhos já reportaram resultados satisfatórios com o uso de microalgas isoladas do próprio efluente no qual seriam cultivadas. Halfhide et al. (2015) obtiveram um consórcio de microalgas de um efluente de tratamento secundário de uma estação de tratamento de esgoto municipal. O lodo deste tratamento secundário foi utilizado no cultivo deste consórcio em fotobiorreatores tubulares verticais com 10 L de volume, durante 7 dias, com iluminação natural e temperatura de 25 a 32°C. Os cultivos eram aerados com 0,5 L.min<sup>-1</sup> de ar enriquecido com 2% de CO<sub>2</sub>. O consórcio apresentou altas remoções de nutrientes, sendo de 74, 65 e 72% para o nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e fósforo total, respectivamente. Estas altas remoções foram associadas à adaptação natural do consórcio de microalgas àquele efluente específico.

De acordo com os resultados apresentados observa-se que se pode isolar uma microalga específica ou utilizar o próprio consórcio de microalgas para cultivo, pois o Consórcio e o Isolado não apresentaram diferença significativa de crescimento e remoção de nutrientes. Segundo Drexler et al. (2014), o uso de microalgas nativas do efluente remove a necessidade de manutenção de monoculturas específicas para o cultivo em esgotos, tornando este cultivo mais simples e com menos custos. Assim, neste estudo, a escolha de uma espécie de microalga externa ao efluente (*C. sorokiniana*) mostrou-se menos eficiente em crescimento quando comparada às microalgas originárias da água negra tratada anaerobicamente nas condições estudadas.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. ETAPA I - PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICROALGAS

Nesta Etapa foi possível obter um consórcio de microalgas a partir da água negra tratada anaerobicamente, o que confirma a existência destas microalgas neste efluente e a capacidade de isolarmos estes microrganismos do próprio meio ambiente no qual serão cultivados. A predominância de microalgas verdes (Filo Clorófitas) do tipo cocóide no consórcio demonstra a adaptação deste filo à água negra tratada anaerobicamente.

### 6.2. ETAPA II – TESTE INICIAL COM CONSÓRCIO DE MICROALGAS CULTIVADO EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Nesta Etapa foi possível observar maior remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo inorgânico nas Bateladas sem enriquecimento de CO<sub>2</sub> em relação aos cultivos com enriquecimento de CO<sub>2</sub>. No entanto, no crescimento das microalgas não houve diferença significativa entre os dois tipos de cultivos.

Considerando estes resultados, o cultivo sem CO<sub>2</sub> mostra-se mais adequado nas condições de cultivo utilizadas na Etapa II por apresentar maior remoção e por necessitar de menores recursos de iluminação e de fornecimento de CO<sub>2</sub> para a sua realização. Concluiu-se também que para o cultivo com CO<sub>2</sub> apresentar melhores resultados de remoção e crescimento seria preciso fornecer maior quantidade de luz, pois 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de intensidade luminosa mostrou-se insuficiente.

### 6.3. ETAPA III - DIFERENTES INÓCULOS DE MICROALGAS CULTIVADOS EM ÁGUA NEGRA TRATADA ANAEROBICAMENTE

Na Etapa III observou-se que o aumento da intensidade luminosa de 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  para 120 – 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , o aumento do inóculo inicial de  $1\times 10^5$  cél. $\text{ml}^{-1}$  para  $1\times 10^6$  cél. $\text{ml}^{-1}$  e a adaptação dos inóculos ao CO<sub>2</sub> melhorou o crescimento das

microalgas nos cultivos mixotróficos, mas apresentou pouca influência na melhoria da remoção de nutrientes nestes.

Em relação à escolha do melhor inóculo de microalga para a realização dos cultivos, a microalga *Chlorella sorokiniana* apresentou menor crescimento em relação ao consórcio de microalgas e à microalga isolada deste consórcio, indicando que a prospecção de microalgas no próprio efluente no qual serão cultivadas é melhor nestas condições estudadas em relação à cepa de microalga de *C. sorokiniana* adquirida de um banco de algas.

O isolamento de uma microalga existente neste consórcio de microalgas mostrou-se importante para verificarmos se o consórcio ou o isolado deste consórcio cresceriam melhor no efluente. Como não houve diferença significativa de crescimento e de remoção de nutrientes entre o reator inoculado com Isolado e o reator inoculado com Consórcio, o uso do consórcio para cultivo elimina a necessidade de técnicas de laboratório para isolamento de cepas únicas, tornando o processo mais simples.

Concluiu-se também que o crescimento de microalgas com aeração sem CO<sub>2</sub> na água negra simulada e tratada em reator UASB (água negra tratada anaerobicamente) utilizada neste trabalho nas condições estudadas mostrou-se eficiente na remoção de nutrientes e apresentou crescimento adequado neste efluente, tornando-o mais simples e com menos custos. No entanto, a escolha de cultivar as microalgas em com ou sem enriquecimento de CO<sub>2</sub> dependerá do objetivo final deste, sendo o cultivo sem CO<sub>2</sub> mais adequado à remoção de nutrientes e o cultivo com CO<sub>2</sub> à produção de microalgas.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Durante a realização deste trabalho pôde-se observar melhorias a serem feitas nos estudos futuros, sendo estas:

- Identificação por método molecular e quantificação das microalgas presentes no consórcio obtido a partir da água negra tratada anaerobicamente.
- Realização de testes específicos para avaliar a influência da variação de temperatura durante o cultivo.
- Realização de análises de Demanda Química de Oxigênio dissolvido para avaliação do consumo e produção de carbono durante o cultivo.
- Melhoria no recipiente utilizado como fotobiorreator, tornando-o mais adequado à penetração da luz.
- Realização de testes com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub> injetado no cultivo para avaliar qual seria mais adequada a este efluente.
- Avaliação das interações entre as microalgas e as bactérias presentes no efluente, buscando entender qual o papel desempenhado por cada uma dentro do ecossistema formado no fotobiorreator, inclusive no consumo dos nutrientes.
- Realização de bateladas com menor quantidade de análises, porém mais específicas, buscando avaliar todos os meios pelos quais os nutrientes são removidos, perdidos ou recuperados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; EL-KHATEEB, M. A.; REGELSBERGER, M.; EL-SHEIKH, R.; SHEHATA, M. Integrated system for the treatment of blackwater and greywater via UASB and constructed wetland in Egypt. *Desalination and Water Treatment*, v. 8, n. 1–3, pp. 272–278, 2009.
- AFNOR - Association Française de Normalisation. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale T90-304. 1980.
- AL KETIFE, A. M. D.; JUDD, S.; ZNAD, H. Optimization of cultivation conditions for combined nutrient removal and CO<sub>2</sub> fixation in a batch photobioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 92, n. 5, 2017.
- ALCÁNTARA, C.; J. M. DOMÍNGUEZ; GARCÍA, D.; BLANCO, S.; PÉREZ, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; MUÑOZ, R. Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic-aerobic algal-bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresour. Technol.*, v. 191, , pp. 173-186, 2015.
- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, v. 4, n. 1, p. 1–4, 1968.
- ALLEN, M. M., AND STANIER, R. Y. Growth and division of some unicellular blue-green algae. *J. Gen. Microbiol.* v. 51, pp. 199–202, 1968.
- ANDERSEN, R. A. (Ed.). Algal culturing techniques. Academic Press, New York, 578 p., 2005.
- ANDRADE, M. D. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de Spirulina. *Quimica Nova*, v. 31, n. 8, pp. 2031–2034, 2008.
- BIJLEVELD M. The Possibilities for Ecological Sanitation in the Netherlands. Enschede, Netherlands: University of Twente; 2003.
- BOHUTSKYI, P.; LIU, K.; NASR, L. K.; BYERS, N.; ROSENBERG, J. N.; OYLER, G. A.; BOUWER, E. J. Bioprospecting of microalgae for integrated biomass production and phytoremediation of unsterilized wastewater and anaerobic digestion centrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 14, pp. 6139–6154, 2015.

- BRIGHTLING, J. Ammonia and the Fertiliser Industry: The Development of Ammonia at Billingham. *Johnson Matthey Technology Review*, v. 62, n. 1, pp. 32–47, 2018.
- BUTKOVSKYI, A.; NI, G.; HERNANDEZ LEAL, L.; RIJNAARTS, H. H. M.; ZEEMAN, G. Mitigation of micropollutants for black water application in agriculture via composting of anaerobic sludge. *Journal of Hazardous Materials*, v. 303, pp. 41–47, 2016.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 19, pp. 360 – 369, 2013.
- CHAMPENOIS, J.; MARFAING, H.; PIERRE, R. Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, v. 27, n. 5, pp. 1845–1851, 2015.
- CHERNICHARO, C. A. de L. *Biological Wastewater Treatment Series: Anaerobic reactors*. Londres: IWA Publishing. 2007.
- CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, C.; KUAN, T.; ONG, S.; LIN, C. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 3389–3396, 2008.
- CORDELL, D.; DRANGERT, J-O.; WHITE, S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, v. 19, pp. 292-305, 2009.
- DAWSON, C. J.; HILTON, J. Fertiliser availability in a resource-limited world: Production and recycling of nitrogen and phosphorus. *Food Policy*, v. 36, n. 14, 2011.
- DE WILT, A., BUTKOVSKYI, A., TUANTET, K., LEAL, L. H., FERNANDES, T. V., LANGENHOFF, A., & ZEEMAN, G. Micropollutant removal in an algal treatment system fed with source separated wastewater streams. *Journal of Hazardous Materials*, v. 304, pp. 84–92, 2016.
- DREXLER, I. L. C.; BEKAAN, S.; ESKANDARI, Y.; YEH, D. H. Implications of nutrient removal and biomass production by native and augmented algal populations at a municipal wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, v. 70, n. 7, pp. 1152–1160, 2014.

- ESREY, S. A.; ANDERSSON, I.; HILLERS, A.; SAWYER R. Ecological sanitation. Sida: México, 1998.
- ESTEVES, F. de A. Fundamentos de Limnologia. 2ª Ed. – Interciência: Rio de Janeiro, 1998.
- FERNANDES, V.; SHRESTHA, R.; SUI, Y.; PAPINI, G.; ZEEMAN, G. Closing Domestic Nutrient Cycles Using Microalgae. *Environmental Science and Technology*, v. 49, n. 20, pp. 12450 – 12456, 2015.
- FERNANDES. B.; DRAGONE, G.; TEIXEIRA, A.; VICENTE, A. Light regime characterization in a photobioreactor for cultivation of microalgae with high starch content for bioethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 161, n. 1-8, pp. 218-226, 2010.
- GARCIA, G.; CARDOSO, A. A.; SANTOS, O. A. M. dos. Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. *Química Nova*, v. 36, n. 9, p. 1468-1476, 2013.
- GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, v. 24, pp. 403–415, 2017.
- GRAAFF, M. S. D. 2010. Resource recovery from black water. PhD Thesis thesis, Wageningen University.
- GUILLARD, R. R. L. Methods for microflagellates and nanoplankton. In: STEIN, J. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press: Cambridge, pp. 80–81, 1973.
- GUO, X.; YAO, L.; HUANG, Q. Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 190, p. 189-195, 2015.
- HALFHIDE, T.; DALRYMPLE, O. K.; WILKIE, A. C.; TRIMMER, J.; GILLIE, B.; UDOM, I.; ERGAS, S. J. Growth of an Indigenous Algal Consortium on Anaerobically Digested Municipal Sludge Centrate: Photobioreactor Performance and Modeling. *Bioenergy Research*, v. 8, n. 1, pp. 249–258, 2015.
- HAN, F.; PEI, H.; HU, W.; SONG, W.; MA, G.; PEI, R. Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the

- conditions along with the growth-state. *Energy Conversion and Management*, v. 90, p. 315-322, 2015.
- HE, P. J.; MAO, B. L. F.; SHAO, L. M., LEE, D. J.; CHANG, J. S. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, v. 146, pp. 562–568, 2013.
  - HWANG, J-H.; CHURCH, J.; LEE, S-J.; PARK, J.; LEE, W. H. Use of Microalgae for Advanced Wastewater Treatment and Sustainable Bioenergy Generation. *Environmental Engineering Science*, v. 33, n. 11, 2016.
  - JI, M. K., ABOU-SHANAB, R. A. I., KIM, S. H., SALAMA, E. S., LEE, S. H., KABRA, A. N., JEON, B. H. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering*, v. 58, pp. 142–148, 2013a.
  - JI, M.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; HWANG, J.; TIMMES, T. C.; KIM, H.; OH, Y.; JEON, B. Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal Of Environmental Engineering*, v. 139, n. 9, p. 1198-1205, 2013b.
  - JUDD, S.; VAN DEN BROEKE, L. J. P.; SHURAIR, M.; KUTI, Y.; ZNAD, H. Algal remediation of CO<sub>2</sub> and nutrient discharges: A review. *Water Research*, v. 87, pp. 356–366, 2015.
  - KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; CHANG, Y. B.; CHIU, T. W.; LIN, H. Y.; CHEN, C. DA; CHANG, J. S.; LIN, C. S. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, v. 166, pp. 485–493, 2014.
  - KESSLER, E. E. Comparative Physiology, Biochemistry, and the Taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Systematic and Evolution*, v. 125, pp. 129-138, 1976.
  - KIM, S.; LEE, Y.; HWANG, S. J. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 85, pp. 511–516, 2013.
  - KIM, S.; PARK, J.; CHO, Y. B.; HWANG, S. J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, v. 144, pp. 8–13, 2013.

- KLIPHUIS, A. M. J.; DE WINTER, L.; VEJRAZKA, C.; MARTENS, D. E.; JANSSEN, M.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Chlorella sorokiniana* in a turbulently mixed short light-path photobioreactor. *Biotechnology Progress*, v. 26, n. 3, pp. 687–696, 2010.
- KOUTRA, E.; ECONOMOU, C. N.; TSAFRAKIDOU, P.; KORNAROS, M. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, v. 36, n. 8, pp. 819–833, 2018.
- KUJAWA-ROELEVELD, K.; ZEEMAN, G. Anaerobic treatment in decentralised and source-separation-based sanitation concepts. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 5, n. 1, pp. 115–139, 2006.
- KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; NAYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 8, pp. 4945–4953, 2011.
- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture médium. *Bioresource Technology*, v. 101, pp. 6012-6018, 2010.
- KUO, C.; CHEN, T.; LIN, T.; KAO, C.; LAI, J.; CHANG, J.; LIN, C. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. *Bioresource Technology*, v. 194, p. 326-333, 2015.
- L. QIN, Z. WANG, Y. SUN, Q. SHU, P. FENG, L. ZHU, J. XU, Z. YUAN Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, pp. 1-9, 2016.
- LIU, X.; YING, K.; CHEN, G.; ZHOU, C.; ZHANG, W.; ZHANG, X.; TAO, Y. Growth of *Chlorella vulgaris* and nutrient removal in the wastewater in response to intermittent carbon dioxide. *Chemosphere*, v. 186, pp. 977–985, 2017.
- M. FRANCHINO, E. COMINO, F. BONA, V.A. Riggio Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, v. 92, n. 6, pp. 738-744, 2013.

- MARKOU, G., VANDAMME, D., & MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, v. 65, n. 7, pp. 186–202, 2014.
- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 87, n. 3, 203–218, 2000.
- MOUSAVI, S., NAJAFPOUR, G. D., MOHAMMADI, M., & SEIFI, M. H. Cultivation of newly isolated microalgae *Coelastrum* sp. in wastewater for simultaneous CO<sub>2</sub> fixation, lipid production and wastewater treatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 14, n. 4, pp. 519-530, 2018.
- MULBRY, W.; WESTHEAD, E. K.; PIZARRO, C.; SIKORA, L. Recycling of manure nutrients: Use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology*, v. 96, n 4, pp. 451–458, 2005.
- NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO<sub>2</sub> biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, v. 16, pp. 216–223, 2016.
- NUSCH E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie–Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, v. 14, pp. 14–36, 1980.
- NWOBA, E. G.; ARYE, J. M.; MOHEYMANI, N. R.; UBI, B. E.; OGBONNA, J. C. Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggery effluent. *Algal Research*, v. 17, p. 268-276, 2016.
- OLGUÍN, E. J. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 1031-1046, 2012.
- OLGUÍN, E. J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, v. 22, pp. 81–91, 2003.
- PACHACAMA, I.; TIRADO, J. O.; DUCHIELA, J.; MANJUNATHA, B.; KUNDAPUR, R. R.; RAJESWARI, B. Evaluation of microalgae's (*Chlorella* sp. and *Synechocystis* sp.) pollutant removal property: Pig effluent as a live

- stock discharge. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6, n. 8, p. 135-141, 2016.
- PANTANO, G.; GROSSELI, G. M.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. Sustentabilidade no uso do fósforo: uma questão de segurança hídrica e alimentar. *Química Nova*, v. 39, n. 6, p. 732-740, 2016.
  - PARK, S.; KIM, J.; YOON, Y.; PARK, Y.; LEE, T. Blending water- and nutrient-source wastewaters for cost-effective cultivation of high lipid content microalgal species *Micractinium inermum* NLP-F014. *Bioresource Technology*, v. 198, 2015.
  - PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, n.1, pp. 11–36, 2011.
  - RAVEN, P. H.; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*, 5<sup>a</sup>. ed. Coord. Trad. J. E. Kraus. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996.
  - RAZZAK, S. A.; ILYAS, M.; ALI, S. A. M., & HOSSAIN, M. M. Effects of CO<sub>2</sub> Concentration and pH on mixotrophic growth of *Nannochloropsis oculata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 176, n. 5, pp. 1290–1302, 2015.
  - RENUKA, N.; SOOD, A.; RATHA, S. K.; PRASANNA, R.; AHLUWALIA, A. S. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *J. Appl. Phycol.* v. 25, pp. 1529–1537, 2013.
  - RICE, E.W. et al. (Eds.) *Standard methods for the examination of water and waste water*. 22 ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 2012.
  - RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology: 2 ed.: West Sussex: Blackwell Publishing, 719 p., 2013.
  - RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high- strength wastes. *Journal Water Pollution Control Federation*, v.38, p. 406-411, 1986.
  - RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

- RUIZ, J.; ÁLVAREZ, P.; ARBIB, Z.; GARRIDO, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation*, v. 13, pp. 884-896, 2011.
- SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. (1984). Nitrifying Bacteria em: “Methods of Soil Analysis – Chemical and Microbiological Properties”, nº 9, parte 2, 2ª Ed., p. 1027-1042, Wisconsin, Estados Unidos.
- SILVA, N. F. P. Crescimento de microalgas em águas residuais: Produção de biomassa e remoção de nutrientes. 2014.86 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto.
- SIMHA, P.; GANESAPILLAI, M. Ecological Sanitation and nutrient recovery from human urine: How far have we come? A review. *Sustainable Environment Research*, v. 27, n. 3, pp. 107–116, 2017.
- SINGH, N. K.; DHAR, D. W. Microalgae as second generation biofuel: a review. *Agronomy Sust. Developm.*, v. 31, 2011.
- STEINMÜLLER H. Alternative wastewater concepts in the solar city Pichling. In: Proceedings of SCST Closing Seminar, Berlin Centre for Competence of Water. Berlin, Germany: Berlin Centre for Competence of Water; 2007
- SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Res.*, v. 45, pp. 3351-3358, 2011.
- TAPIA, C.; FERMOSO, F. G.; SERRANO, A.; TORRES, Á.; JEISON, D.; RIVAS, M.; CUARESMA, M. Potential of a local microalgal strain isolated from anaerobic digester effluents for nutrient removal. *Journal of Applied Phycology*, 2018.
- THAWECHAI, T.; CHEIRSILP, B.; LOUHASAKUL, Y.; BOONSAWANG, P.; PRASERTSAN, P. Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies. *Bioresource Technology*, v. 219, pp. 139–149, 2016.
- TUANTET K, TEMMINK H, ZEEMAN G, JANSSEN M, WIJFFELS RH, BUISMAN CJN Nutrient removal and microalgal biomass production on urine in a short light-path photobioreactor. *Water Res*, v. 55, pp. 162–174, 2014.

- VALDEZ, F. Q. Ocorrência e remoção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo (UASB) operando com esgoto sanitário e águas negras simuladas. 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- VAN HAANDEL, A.; GIRARD, L.; MENDONÇA, N.; TEIXEIRA, M.; VON SPERLING, M. Remoção Biológica de Fósforo no Sistema de Lodo Ativado: Mecanismos e Configurações. In: Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. (coordenadores). Rio de Janeiro: ABES, 2009.
- VAN HAANDEL, A.; KATO, M.; VON SPERLING, M. Remoção Biológica de Nitrogênio: Aplicações para o Sistema de Lodo Ativado. In: Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. (coordenadores). Rio de Janeiro: ABES, 2009.
- VON MÜNCH E, INGLE R. Compilation of 25 Case Studies on Sustainable Sanitation Projects from Africa. Eschborn, Germany: Sustainable Sanitation Alliance; 2012.
- VON SPERLING, M. Urban wastewater treatment in Brazil. Inter-American Development Bank, 102 pp., 2016.
- VON SPERLING, M. Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal. London: IWA Publishing, 296 pp., (Biological Wastewater Treatment Series, v. 1), 2007.
- WANG, L.; MIN, M.; LI Y, CHEN P, CHEN Y, LIU Y, WANG Y, RUAN R Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotech*, v. 162, n. 4, pp. 1174–1186, 2010.
- WANG, Y.; GUO, W.; YEN, H.; HO, S.; LO, Y.; CHENG, C.; REN, N.; CHANG, J. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. *Bioresource Technology*, v. 198, p. 619-625, 2015.
- WERNER C, PANESAR A, RÜD SB, OLT CU. Ecological sanitation: principles, technologies and project examples for sustainable wastewater and excreta management. *Desalination*, v. 401, pp. 248-392, 2009.

- WORLD WIDE FOUND FOR NATURE. *Living Planet Report: Risk and resilience in a new era*. Suíça: WWF International, 2016.
- WU, T.; HU, H.; YU, Y.; ZHANG, T.; ZHU, S.; ZHUANG, L.; ZHANG, X.; LU, Y. Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.33, p. 675-688, 2014.
- YAO, L.; SHI, J.; MIAO, X. Mixed Wastewater Coupled with CO<sub>2</sub> for Microalgae Culturing and Nutrient Removal. *Plos One*, v. 10, n. 9, 2015.
- ZHAI, J.; LI, X.; LI, W.; RAHAMAN, M. H.; ZHAO, Y.; WEI, B.; WEI, H. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological Engineering*, v. 108, pp. 83–92, 2017.
- ZHOU, W.; WANG, J.; CHEN, P.; JI, C.; KANG, Q.; LU, B.; RUAN, R. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 76, 2017.
- ZNAD, H.; AL KETIFE, A. M. D.; JUDD, S.; ALMOMANI, F.; VUTHALURU, H. B. Bioremediation and nutrient removal from wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, v. 110, n. 10, pp. 1–7, 2018.