



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

SÍLVIA MARIANA DA SILVA BARBOSA

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS PARA TRATAMENTO
DE EFLUENTES E PRODUÇÃO LIPÍDICA**

Recife

2019

SÍLVIA MARIANA DA SILVA BARBOSA

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS PARA TRATAMENTO
DE EFLUENTES E PRODUÇÃO LIPÍDICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Recife

2019

SÍLVIA MARIANA DA SILVA BARBOSA

**UTILIZAÇÃO DE MICROALGAS E CIANOCABTÉRIAS PARA TRATAMENTO
DE EFLUENTES E PRODUÇÃO LIPÍDICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Civil.

Aprovada em: 15 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a M^a de Lourdes Florencio dos Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wamberto Raimundo da Silva Júnior (Examinador externo)
Instituto Federal da Paraíba

Prof.^a Dr.^a Yllana Ferreira Marinho (Examinadora externa)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Alfredo de Oliveira Galvéz (Examinador externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Amaral Pastich Gonçalves (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco – Campus Agreste

Dedico este trabalho à minha irmã Suzane
Barbosa; exemplo de plenitude e temperança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer sempre presente em minha vida, por trazer calma ao meu coração e a certeza de que tudo daria certo.

À minha família, pela doação diária de amor e especialmente a meus pais Eliane e Severino e à irmã Suzane que sempre acreditaram em minha coragem.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lourdinha Florencio pela confiança depositada e por todas as oportunidades a mim concedidas. Sou imensamente grata.

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo grupo algas nesses 4 anos: Isabela Marques, Kamila Cardoso, Paulo Silva e Amanda Santos. Este trabalho é NOSSO! Recebam minha gratidão.

Aos amigos do LSA (Laboratório de Saneamento Ambiental), pelo apoio profissional e pessoal, pela família que se formou ao longo desses anos: Denise, Larissa, Oucilane, Osmar, Sofia, Rhayssa, Antônio, Idayana, Bárbara Branco, Bárbara Karoline, Poliana, Juliana, Marcus Vinicius, Marcos Sales, Carlos Murilo e Edécio. Aos técnicos Iago, Danúbia e Ronaldo.

À minha grande amiga Marcella Paiva. Agradeço pela motivação constante, pelos exemplos de profissionalismo e garra. Obrigada por sua amizade.

Ao amigo Luiz Galdino, que nunca poupou esforços para me ajudar no laboratório. Obrigada pela presteza e pelas conversas inspiradoras.

À amiga Elizabeth Laura (Bethzinha) pela ajuda após os expedientes do trabalho e aos finais de semana na reta final da escrita dessa tese.

Aos professores Dr. Mário Kato, Dr.^a Sávía Gavazza e Dr. Wanderli Leite, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à professora Elizabeth Pastich, que foi uma peça fundamental durante meus primeiros passos acadêmicos.

Aos professores Alfredo Galvéz e Yllana Marinho por todos os ensinamentos no tema microalgas. À amiga Jéssika Lima, aluna do Laboratório de Produção de Alimento Vivo, por toda contribuição dada na parte experimental desse trabalho.

Aos professores turcos Mohamed Topkaya, Altinay Perendeci e Ethen Karadirek por me receberem na Akdeniz Universitesi, em Antalya. À professora Burçu Ertit, colaboradora da Universidade de Ankara. Ao professor Andreas Haarstrick do grupo EXCEED, pelo apoio nas questões burocráticas do intercâmbio.

Aos colegas turcos: Alper, Elçin, Mona, Murat, Oguzhan, Hilal e Kaya pelo apoio constante e pelos momentos memoráveis durante minha estadia na Akdeniz Universitesi.

Aos amigos da Sanvale Soluções Ambientais, em especial ao Sr. Rogério Ribeiro, meu chefe e grande amigo. À Alberto, Kalyanne e Thiago por todo apoio e compreensão nessa importante etapa da minha vida.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao projeto alemão Swindon-Exceed (DAAD), pelo financiamento de minha estadia na Akdeniz Universitesi na Turquia.

À FACEPE, FINEP, CAPES, CNPq, INCT ETEs Sustentáveis e Fibra Técnica Ltda pelo apoio ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da UFPE.

Gratidão à Universidade Federal de Pernambuco, todo seu corpo docente, técnico e administrativo. Sou muito grata pelo **privilégio** de desfrutar de um ensino público superior de qualidade, ao longo dos 14 anos de minha vida acadêmica. Resistiremos!

RESUMO

Organismos fotossintetizantes crescem em efluentes domésticos e industriais devido à presença de nutrientes, incorporando-os em seu metabolismo, promovendo o tratamento desses efluentes, produzindo biomassa e acumulando lipídeos essenciais à produção de biocombustíveis. As microalgas (*Desmodesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*) e a cianobactéria (*Oscillatoria tennuis*) foram cultivadas de modo otimizado em efluente doméstico e têxtil sintético, buscando-se o tratamento desses efluentes e paralela produção de lipídeos. No experimento 1, para avaliar o efeito da relação C:N e densidade microbiana sobre a produção de biomassa, lipídeos e tratamento do efluente, foi utilizado esgoto doméstico, proveniente de diversas etapas de tratamento: afluente (A), pós UASB (E1), pós lagoa (E2) e pós filtro de pedras (E3), sendo estes utilizados *in natura* e submetidos a pré tratamento por filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A). Melhor produtividade de biomassa foi observada em esgoto contendo relação C:N 6:1 - afluente (A): 2,1 g.L⁻¹ (*D. subspicatus*) e 5:1 - pós UASB (E1): 2,5 g.L⁻¹ (*C. vulgaris*). Os mesmos, continham maiores densidades de bactérias heterotróficas: 55.10⁶ e 36.10⁵ NMP respectivamente. Um maior rendimento lipídico foi visto em C:N 3:1 - pós filtro (E3): 530 mg.g⁻¹ (*D. subspicatus*) e 500 mg.g⁻¹ (*C. vulgaris*). Não houve favorecimento na produção de FAMES. A remoção de nutrientes foi elevada em todos os cultivos, com eficiências de N e P variando de 88 a 100% e remoção de DBO, variando de 56 a 100% em ambas as espécies. No experimento 2, avaliou-se o efeito do foto-período, em condições de autotrofia, mixotrofia e heterotrofia (Fase I), a condição mixotrófica favoreceu as espécies na produtividade de biomassa: 3,05 g.L⁻¹ e 2,0 g.L⁻¹ no rendimento lipídico 560 mg.g⁻¹ e 481 mg.g⁻¹ e FAMES 95 mg.g⁻¹ e 80 mg.g⁻¹ para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* respectivamente. Na Fase II, avaliando diferentes regimes claro:escuro, a espécie *D. subspicatus* foi favorecida na produtividade de biomassa (3,09 g.L⁻¹), rendimento lipídico (309 mg.g⁻¹) e FAMES (110 mg.g⁻¹), em regime de maior fase clara (14h:10h), ao passo que *C. vulgaris* obteve maior produtividade de biomassa (2,88 g.L⁻¹), rendimento lipídico (389 mg.g⁻¹) e FAMES (118 mg.g⁻¹) em regime de maior fase escura (10h:14h). A remoção de N e P, variou nas duas fases de 88 a 100% e de 26 a 100% de DBO. No experimento 3, avaliou-se a tratabilidade do efluente têxtil pela cianobactéria *O. tennuis*. Maior eficiência na remoção de cor (90%), sulfato (98%) produção de biomassa (1,0 g.L⁻¹) e lipídeos (398 mg.g⁻¹) foi dada em condição de cultivo suspenso, autotrofia e usando glicose como fonte de C (Fase I). Já na Fase II, melhor remoção de DQO (84 e 98%), N e P (99%) produção de biomassa (1,8 e 1,7 g.L⁻¹) lipídeos (401 e 418 mg.g⁻¹) foi observada, na biomassa suspensa, sob mixotrofia (16h:8h) e

utilizando glicose ou etanol como fonte de C respectivamente. Em relação à produtividade de FAMES, *O. tenuis* não mostrou-se uma espécie promissora quando cultivada em efluente têxtil, obtendo resultados inferiores aos observados no controle contendo meio BG-11.

Palavras-chave: Microalgas. Cianobactérias. Esgoto doméstico. Efluente têxtil. Lipídeos.

ABSTRACT

Photosynthetic organisms grow in domestic and industrial effluents due to the presence of nutrients, incorporating them into their metabolism, promoting the treatment of these effluents, producing biomass and accumulating lipids essential for biofuel production. Microalgae (*Desmodesmus subspicatus* and *Chlorella vulgaris*) and cyanobacteria (*Oscillatoria tennuis*) were optimally cultivated in domestic wastewater and synthetic textiles, seeking the treatment of these effluents and parallel lipid production. In experiment 1, to evaluate the effect of C:N ratio and microbial density on biomass production, lipids and effluent treatment, domestic wastewater was used from several treatment steps: affluent (A), post UASB (E1), post pond (E2) and post rock filter (E3). It were used *in natura* and subjected to pretreatment by filtration (F) and filtration followed by autoclave (F + A). Better biomass productivity was observed in sewage containing ratio C:N 6:1 - tributary (A): 2.1 gL⁻¹ (*D. subspicatus*) and 5:1 – post UASB (E1): 2.5 gL⁻¹ (*C. vulgaris*). They contained higher densities of heterotrophic bacteria: 55.10⁶ and 36.10⁵ MPN respectively. A higher lipid yield was seen at C:N 3:1 – post rock filter (E3): 530 mg.g⁻¹ (*D. subspicatus*) and 500 mg.g⁻¹ (*C. vulgaris*). There was no favoritism in the production of FAMEs. Nutrient removal was high in all crops, with N and P efficiencies ranging from 88 to 100% and BOD removal ranging from 56 to 100% in both species. In experiment 2, the effects of the photo-period was evaluated under conditions of autotrophy, mixotrophy and heterotrophy (Phase I), the mixotrophic condition favored the species in biomass productivity: 3.05 gL⁻¹ and 2.0 gL⁻¹ in lipid yield 560 mg.g⁻¹ and 481 mg.g⁻¹ and FAMEs 95 mg.g⁻¹ and 80 mg.g⁻¹ for *D. subspicatus* and *C. vulgaris* respectively. In Phase II, evaluating different light: dark regimes, *D. subspicatus* was favored in biomass productivity (3.09 gL⁻¹), lipid yield (309 mg.g⁻¹) and FAMEs (110 mg.g⁻¹)., at higher light phase (14h: 10h), while *C. vulgaris* obtained higher biomass productivity (2.88 gL⁻¹), lipid yield (389 mg.g⁻¹) and FAMEs (118 mg.g⁻¹) in the darkest phase (10h: 14h). The removal of N and P varied in both phases from 88 to 100% and from 26 to 100% of BOD. In experiment 3, the treatment of textile effluent by cyanobacterium *O. tennuis* was evaluated. Higher efficiency in color removal (90%), sulfate (98%) biomass production (1.0 gL⁻¹) and lipids (398 mg.g⁻¹) was given under suspended cultivation, autotrophy and using glucose as C source (Phase I). In Phase II, better COD removal (84 and 98%), N and P (99%) biomass production (1.8 and 1.7 gL⁻¹) lipids (401 and 418 mg.g⁻¹) was obtained. observed in the suspended biomass, under myxotrophy (16h: 8h) and using glucose or ethanol as C source respectively. Regarding the yield of FAMEs, *O.*

tennis was not a promising species when cultivated in textile effluent, obtaining results inferior to those observed in control containing BG-11 medium.

Keywords: Microalgae. Cyanobacteria. Domestic sewage. Textile effluent. Lipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da fotossíntese simplificada.....	33
Figura 2 – Síntese lipídica na fotossíntese.	34
Figura 3 – Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 1.	43
Figura 4 – Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 2.	44
Figura 5 – Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 3.	45
Figura 6 – Organograma das etapas do cultivo inicial das microalgas para aumento da densidade e volume do inoculo.....	47
Figura 7 – Adaptação das cepas de cianobactéria à ambiente salobro.	49
Figura 8 – Organograma das etapas do cultivo inicial das cianobactérias para aumento da densidade e volume do inoculo.....	50
Figura 9 – Organograma do procedimento realizado para o cultivo de microalgas em efluentes domésticos.....	51
Figura 10 – Organograma do procedimento realizado para o cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto.....	53
Figura 11 – Solubilização do amido	56
Figura 12 – Organograma do procedimento realizado para o cultivo de cianobactérias em efluente têxtil sintético.....	58
Figura 13 – Câmara de Neubauer com respectivos quadrantes para quantificação de altas (vermelho) e baixas densidades celulares (azul).	60
Figura 14 – Curvas de crescimento de <i>D. subspicatus</i> em afluente bruto (A), efluente de UASB (B), efluente de lagoa de polimento (C) e filtros de pedra (D), submetidos à filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A).....	70
Figura 15 – Curvas de crescimento de <i>C. vulgaris</i> em afluente bruto (A), efluente de UASB (B), efluente de lagoa de polimento (C) e filtros de pedra (D), submetidos à filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A).....	71
Figura 16 – Remoção de N-NH ₄ ⁺ por meio de <i>D.subspicatus</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.	76
Figura 17 – Remoção de P-PO ₄ ³⁻ por meio de <i>D.subspicatus</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.	76
Figura 18 – Remoção de N-NH ₄ ⁺ por meio de <i>C.vulgaris</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.	77

Figura 19 – Remoção de P-PO ₄ ³⁻ por meio de <i>C. vulgaris</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.	78
Figura 20 – Remoção de N-NH ₄ ⁺ por meio de <i>D. subspicatus</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.....	80
Figura 21 – Remoção de P-PO ₄ ³⁻ por meio de <i>D. subspicatus</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.....	80
Figura 22 – Remoção de N-NH ₄ ⁺ por meio de <i>C. vulgaris</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.	81
Figura 23 – Remoção de P-PO ₄ ³⁻ por meio de <i>C. vulgaris</i> cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.	81
Figura 24 – Contribuição da remoção de DBO dissolvida via processos de oxidação. Experimentos sem microalgas. DBO ₀ : inicial e DBO _f : final.	83
Figura 25 – Densidade Bacteriana inicial (B ₀), e final, após 15 dias de cultivo (B _f), para <i>D. subspicatus</i> e <i>C. vulgaris</i>	85
Figura 26 – Rendimento volumétrico de biomassa de <i>D. subspicatus</i>	86
Figura 27 – Rendimento volumétrico de biomassa de <i>C. vulgaris</i>	86
Figura 28 – Rendimento de óleo total (%) por <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B), em comparação ao rendimento médio de biomassa, cultivadas no afluyente bruto, pós UASB, pós lagoa e pós filtros de pedra.	88
Figura 29 – Concentração FAME e óleo total de <i>D. subspicatus</i>	89
Figura 30 – Concentração FAME e óleo total de <i>C. vulgaris</i>	90
Figura 31 – Composição de ácidos graxos no óleo total produzido por <i>D. subspicatus</i> em todas as condições de cultivo.....	92
Figura 32 – Composição de ácidos graxos no óleo total produzido por <i>C. vulgaris</i> em todas as condições de cultivo.	98
Figura 33 – Curva de Crescimento de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante Fase I.	105
Figura 34 – Curva de Crescimento de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico (14h:10 e 10:14h) claro:escuro, durante Fase II.	105
Figura 35 – Rendimento volumétrico da biomassa de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) em meios autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico durante a Fase I.	109
Figura 36 – Rendimento da biomassa de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) em meios fotoheterotrófico sob condição de iluminação 14h:10h e 10h:14h claro: escuro respectivamente durante a Fase II.....	109

Figura 37 – Decaimento de $N-NH_4^+$ nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.....	111
Figura 38 – Decaimento de $N-NH_4^+$ nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.....	111
Figura 39 – Decaimento de $P-PO_4^{3-}$ nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.....	111
Figura 40 – Decaimento de $P-PO_4^{3-}$ nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.....	112
Figura 41 – Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.	113
Figura 42 – Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.	113
Figura 43 – Comportamento do pH nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.....	115
Figura 44 – Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.	115
Figura 45 – Comportamento do clorofila α nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.....	117
Figura 46 – Comportamento do clorofila α nos cultivos de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) sob metabolismo fotoheterotrófico, nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.	117
Figura 47 – Percentagem de óleo total e rendimento de biomassa de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) na Fase I.....	119
Figura 48 – Percentagem de óleo total e rendimento de biomassa de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) na Fase II.	119

Figura 49 – Concentração de FAMES e óleo total de <i>D. subspicatus</i> (A) e <i>C. vulgaris</i> (B) na Fase I.....	121
Figura 50 – Concentração de FAMES e óleo total de <i>D. subspicatus</i> e <i>C. vulgaris</i> na Fase II.	122
Figura 51 – Conteúdo de clorofila α nas células ao final das Fases I e II, comparado ao pH do meio.	126
Figura 52 – Comportamento do sulfato no efluente durante as Fases I e II.	128
Figura 53 – Reatores ao final do experimento exibindo crostas nas paredes e partículas sobrenadantes, podendo estar associadas a remoção abiótica de sulfato e cor....	129
Figura 54 – Remoção de DQO por meio de <i>Oscillatoria tennuis</i> nas Fases I e II.	130
Figura 55 – Degradação do corante DB 22 nos cultivos contendo a cianobactéria <i>Oscilatória tennuis</i>	132
Figura 56 – Coloração de efluentes nos diferentes reatores no 2º dia de experimento durante a Fase I.....	133
Figura 57 – Coloração de efluentes nos diferentes reatores no 2º dia de experimento durante a Fase II.....	133
Figura 58 – Remoção do corante no reator R1, podendo estar associado a ligação com alginato. 7º dia de cultivo.	134
Figura 59 – Beads de cianobactérias antes (A) e depois (B) do experimento. Tamanho dos beads utilizados (C e D) Fase I. Detalhe para os grumos de corante.....	135
Figura 60 – Filamentos negros de <i>O. tennuis</i> aderidos à mangueira de aeração em reator R2, no 10º dia de cultivo durante a Fase I do experimento (A). Grumos de <i>O. tennuis</i> observados em todos os reatores da Fase II. (B) A mesma estrutura também foi observada no reator controle da Fase II (C). 14º dia de cultivo.	137
Figura 61 – Aspecto do filamento de <i>O. tennuis</i> em suspensão (Reator R2) após a Fase I. ..	137
Figura 62 – Aspecto do filamento de <i>O. tennuis</i> em suspensão (Reator R2) após a Fase II. .	138
Figura 63 – Concentrações de $N-NH_4^+$ nos reatores durante as Fases I (A) e II (B).	139
Figura 64 – Concentrações de $P-PO_4^{3-}$ nos reatores durante as Fases I (A) e II (B).	139
Figura 65 – Conteúdo de óleo total e FAME's de interesse gerado pela biomassa durante a Fase I.....	142
Figura 66 – Conteúdo de óleo total e FAME's de interesse gerado pela biomassa durante a Fase II.....	142

Figura 67 – Percentagem de FAMES produzidos pela biomassa imobilizada (R1) e suspensa (R2) cultivada em fluente têxtil utilizando glicose como fonte de carbono, durante a Fase I.	143
Figura 68 – Percentagem de FAMES produzidos pela biomassa cultivada em fluente têxtil utilizando amido (A), glicose (G), etanol (E) como fonte de carbono e meio BG-11 (controle), durante a Fase II.	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de óleo e área para cultivo de oleaginosas e microalgas para produção de biodiesel.	37
Tabela 2 – Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias. ...	38
Tabela 3 – Composição do meio comercial Provazzoli® com vitaminas do complexo B.	47
Tabela 4 – Composição do meio comercial BG-11® com micronutrientes A5.....	49
Tabela 5 – Composição da solução de micronutrientes	54
Tabela 6 – Composição da solução de macronutrientes.....	55
Tabela 7 – Composição do efluente têxtil sintético nos fotobioreatores.	56
Tabela 8 – Características dos efluentes de diferentes etapas de tratamento na ETE Rio Formoso.	61
Tabela 9 – Características dos efluentes (pré tratados) de diferentes etapas de tratamento. ...	62
Tabela 10 – Eficiências de remoção nos diferentes meios de cultivo (%).	62
Tabela 11 – Produtividade de <i>Desmodesmus subspicatus</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> nos diferentes efluentes.....	64
Tabela 12 – Taxas máximas de crescimento (r) dia^{-1} , produtividade celular média (P) $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, taxa de remoção de N e P (μN e μP) dia^{-1} , duplicações por dia (k) dia^{-1} e tempo de duplicação (T_2) dia^{-1} para <i>D. subspicatus</i> e <i>C. vulgaris</i> nos meios de cultivo utilizados.....	64
Tabela 13 – Características do efluente doméstico bruto utilizado nas Fases I e II.	67
Tabela 14 – Eficiências de remoção das Fases I e II (%).	67
Tabela 15 – Produtividade de <i>Desmodesmus subspicatus</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> nas Fases I e II.....	68
Tabela 16 – Taxas máximas de crescimento (r) dia^{-1} , produtividade celular média (P) $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, taxa de remoção de N e P (μN e μP) dia^{-1} , duplicações por dia (k) dia^{-1} e tempo de duplicação (T_2) dia^{-1} para <i>D. subspicatus</i> e <i>C. vulgaris</i> nos meios de cultivo utilizados no experimento 2.....	69
Tabela 17 – Conteúdo dos reatores nas Fases I e II.....	74
Tabela 18 – Características do efluente têxtil utilizado no experimento.....	103
Tabela 19 – Eficiências de remoção das Fases I e II.	103
Tabela 20 – Produtividade de <i>Oscillatoria tennuis</i> utilizada nas Fases I e II deste experimento.	104

Tabela 21 - Taxas máximas de crescimento (r) dia^{-1} , produtividade celular média (P) $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, taxa de remoção de N e P (μN e μP) dia^{-1} , duplicações por dia (k) dia^{-1} e tempo de duplicação (T_2) dia^{-1} para <i>D. subspicatus</i> e <i>C. vulgaris</i> nos meios de cultivo utilizados no experimento 2	110
Tabela 22 - Conteúdo dos reatores nas Fases I e II.....	123
Tabela 23 - Características do efluente têxtil utilizado no experimento.....	123
Tabela 24 - Eficiências de remoção das Fases I e II.....	124
Tabela 25 - Produtividade de <i>Oscillatoria tenuis</i> utilizada nas Fases I e II deste experimento.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
DB22	<i>Direct Black 22</i>
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DCM _{ax}	Densidade Celular Máxima
DCM _{ed}	Densidade Celular Média
DEPAQ	Departamento de Pesca Aquicultura
DQO	Demanda química de oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAMES	Fatty Acid Methyl Esters
<i>k</i>	Duplicações algal por dia
LAPAVI	Laboratório de Produção de Alimento Vivo
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
<i>lux</i>	Fótons de luz incidente
MM	Massa molar
N	Densidade celular
N ₀	Densidade celular inicial
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
Od	Optical Density
OD	Oxigênio dissolvido
P	Produtividade algal
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>r</i>	taxa de crescimento algal
R ²	Correlação de ajuste
SS	Sólidos sedimentáveis
SSV	Sólidos suspensos voláteis
t ₀	Tempo inicial
t _f	Tempo final
TDH	Tempo de detenção hidráulica
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket</i>
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVO	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	MICROALGAS: ASPECTOS GERAIS	25
3.2	TÉCNICAS DE CULTIVO MASSIVO DE MICROALGAS	26
3.2.1	Fotobioreatores fechados	26
3.2.2	Lagoas abertas	26
3.2.3	Lagoas de alta taxa	26
3.2.4	Sistemas híbridos	27
3.3	PARÂMETROS QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE MICROALGAL.....	27
3.3.1	Luz	27
3.3.2	Fontes de carbono.....	28
3.3.3	Nutrientes	29
3.3.4	Temperatura	29
3.3.5	Competição com outros micro-organismos.....	30
3.4	REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO DAS MICROALGAS	30
3.5	SÍNTESE DE LIPÍDEOS NAS MICROALGAS.....	32
3.6	OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO LIPÍDICA POR MICROALGAS.....	35
3.7	PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DOS LIPÍDEOS INTRACELULARES DAS MICROALGAS.....	37
3.8	EXTRAÇÃO LIPÍDICA DAS MICROALGAS	38
3.9	PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE LIPÍDEOS INTRACELULARES DAS MICROALGAS.....	39
3.10	TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DOMÉSTICAS E INDUSTRIAIS POR MICROALGAS.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
4.1.1	Experimento 1: Cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto e tratado.....	42
4.1.2	Experimento 2: Cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto	43
4.1.3	Experimento 3: Cultivo de cianobactérias em efluente têxtil sintético	44
4.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	46
4.2.1	Preservação das cepas e cultivo das microalgas	46
4.2.2	Água para preservação das cepas e cultivo inicial das microalgas	46

4.2.3	Preservação das cepas das microalgas.....	46
4.2.4	Cultivo inicial das microalgas	47
4.2.5	Preservação das cepas e cultivo das cianobactérias	48
4.2.6	Água para preservação das cepas e cultivo inicial das cianobactérias	48
4.2.7	Preservação das cepas das cianobactérias.....	48
4.4.8	Adaptação das cianobactérias em ambiente salobro.....	49
4.2.9	Cultivo inicial das cianobactérias.....	49
4.2.10	Montagem e operação do Experimento 1: cultivo de microalgas em efluentes doméstico....	
	50
4.2.11	Montagem e operação do Experimento 2: cultivo de microalgas em efluente doméstico....	
	51
4.2.12	Montagem e operação do Experimento 3: cultivo de cianobactérias em efluente têxtil	
	53
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	59
4.3.1	Análises para determinação de parâmetros microbiológicos	59
4.3.2	Análises para determinação de parâmetros físico-químicos	61
4.3.3	Análises para quantificação e caracterização do óleo total das microalgas e cianobactérias	62
4.3.4	Análise estatística	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA RELAÇÃO C/N E DENSIDADE BACTERIANA SOB O CRESCIMENTO DE <i>DESMODESMUS SUBSPICATUS</i> E <i>CHLORELLA VULGARIS</i> PARA TRATAMENTO DO EFLUENTE E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS	66
5.1.1	Efluentes utilizados no experimento 1	66
5.1.2	Características dos efluentes provenientes de diferentes etapas de tratamento	66
5.1.3	Escolha das espécies de microalgas.....	69
5.1.4	Crescimento das microalgas	70
5.1.5	Relação C:N, densidade bacteriana e crescimento	72
5.1.6	Taxa de crescimento, produtividade e tempo de duplicação	74
5.1.7	Remoção de nutrientes	75
5.1.8	Remoção de DBO dissolvida.....	82
5.1.9	Contribuição bacteriana na remoção de DBO dissolvida	83
5.1.10	Rendimento de biomassa e estocagem de óleo total.....	85
5.1.11	Qualificação do óleo total.....	89
5.2	EXPERIMENTO 2: EFEITOS DE VARIAÇÕES DO FOTO PERÍODO NO CRESCIMENTO E ACUMULAÇÃO LIPÍDICA DE <i>D. SUBSPICATUS</i> E <i>C. VULGARIS</i>	103

5.2.1	Efluentes utilizados no experimento 2	103
5.2.2	Características do efluente doméstico bruto utilizado nas Fases I e II.....	103
5.2.3	Crescimento da biomassa	104
5.2.4	Remoção de nutrientes.....	110
5.2.5	Remoção de DBO dissolvida.....	113
5.2.6	Aspectos fotossintéticos.....	115
5.2.7	Produção de biomassa, óleos totais e FAMEs de interesse	118
5.3	EXPERIMENTO 3: USO DA CIANOBACTÉRIA <i>OSCILLATORIA TENNUIS</i> PARA TRATAMENTO DE EFLUENTE TEXTIL E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS.....	123
5.3.1	Efluente utilizado no experimento 3	123
5.3.2	Características do efluente têxtil nas Fases I e II	123
5.3.3	Aspectos fotossintéticos: adaptação da cianobactéria no efluente têxtil.....	125
5.3.4	Sulfatos	128
5.3.5	Remoção de DQO	129
5.3.6	Remoção de cor.....	132
5.3.7	Remoção de nutrientes.....	138
5.3.8	Produção de biomassa, óleo e FAMES de interesse	141
6	CONCLUSÕES	146
6.1	EXPERIMENTO 1.....	146
6.2	EXPERIMENTO 2.....	147
6.3	EXPERIMENTO 3.....	148
	REFERÊNCIAS	149
	ANEXO A - Estatística.....	158

1 INTRODUÇÃO

Tecnologias baseadas no cultivo de microalgas para produção de combustíveis renováveis já são estudadas há pelo menos 50 anos (ROOSTAEI *et al.*, 2018). No entanto, nos últimos anos os estudos sobre o tema têm aumentado em razão da crescente demanda por energia e os altos custos de produção e transporte do petróleo, além dos impactos ambientais negativos causados pela queima de combustíveis fósseis (WANG *et al.*, 2011).

Culturas vegetais como, milho, soja, girassol, palma, beterraba e cana de açúcar podem ser utilizados na produção de biocombustíveis (WANG *et al.*, 2011). No entanto, a produção de biodiesel a partir dessas espécies oleaginosas compete com a de alimentos, já que ambas necessitam de áreas férteis para cultivo. Isto tem aumentando a necessidade de desmatamento para obtenção de áreas livres, comprometendo a biodiversidade de uma região; além de promover mudanças na estrutura do mercado de alimentos, com aumento de preços e o uso de práticas agrícolas insustentáveis (PARK; CRAGGS, 2010).

A produção de biocombustível a partir de microalgas tem como principais vantagens: (i) não competir por áreas agricultáveis, (ii) não necessitar de agrotóxicos e consumo excessivo de água, e (iii) apresentar altas taxas de crescimento da biomassa com elevado teor lipídico intracelular (essencial à produção de biocombustível) (O'GRADY; MORGAN, 2011). O cultivo também pode ser realizado com a utilização de esgotos domésticos ou industriais, utilizando o carbono e os nutrientes presentes nestes efluentes (WANG *et al.*, 2011). Logo, esta prática também estará associada à remediação de águas residuárias.

O cultivo de microalgas de forma controlada é normalmente realizado em sistemas de lagoas abertas ou foto biorreatores fechados em diversas escalas (CHISTI, 2007). Nesses sistemas o cultivo pode ser conduzido de modo a se obter ganhos no volume da biomassa, produtividade lipídica e a remoção dos nutrientes e matéria orgânica. A eficiência desta prática depende principalmente da: (i) espécie(s) envolvida(s), (ii) condições de iluminação, e (iii) e do aporte de carbono e nutrientes (ROOSTAEI *et al.*, 2018).

Em função da disponibilidade de energia luminosa e do tipo de fonte de carbono disponível, algumas espécies de microalgas podem assumir diversos tipos de metabolismos (autotróficos, heterotróficos e fotoheterotróficos) e algumas espécies possuem a capacidade de modificar o tipo de metabolismo atuante como resposta a alterações bruscas no meio, tais como

a disponibilidade e tipo de alimento, ou pela escassez ou mudança de fonte luminosa (CHISTI, 2007). Devido a estas características, algumas espécies de microalgas, especialmente as da divisão *Chlorophyta* e *Cyanophyta* têm sido amplamente cultivadas para diversos fins (CHISTI, 2007). Esses organismos apresentam vantagens de produzirem um alto teor de conteúdo lipídico, são resistentes em termos de cargas aplicadas ao cultivo e, principalmente porque são abundantes em vários ambientes. Em adição, esses organismos apresentam capacidade de removerem altas taxas de nutrientes dissolvidos e matéria orgânica de efluentes domésticos (MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2009).

Deve-se levar em consideração ainda, o grande potencial atribuído a um outro grupo de organismos fotossintetizantes: as cianobactérias, especialmente as do grupo *Nostoc*, *Anabaena* e *Oscillatoria* (DELLAMATRICE *et al.*, 2017). Esses organismos, quando cultivados de modo controlado, podem atuar como poderosos agentes de descontaminação de ambientes poluídos, visto que se podem adaptar, consumir e degradar uma grande variedade de compostos recalcitrantes (SUBASHCHANDRABOSE *et al.*, 2011), adicionalmente, podem posteriormente ser utilizadas no processamento de lipídeos.

A produção de biodiesel a partir de ácidos graxos inclui duas etapas: superprodução de ácidos graxos e transesterificação de ácidos graxos. A dificuldade está na liberação dos lipídeos, a partir de sua localização intracelular, de forma mais eficiente em termos energéticos e econômicos (FRANCO, 2013).

A otimização dos sistemas de crescimento de microalgas, a maximização da produção de triglicerídeos e a determinação de métodos mais eficientes para colheita, extração do óleo e produção de biodiesel, são necessárias para tornar a produção do biocombustível, a partir de microalgas, mais sustentável. A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais é uma opção atrativa, pois além do tratamento destas águas, os lipídeos, acumulados no meio intracelular das microalgas, podem ser utilizados para a produção de biocombustível; diminuindo custos de produção industrial e a necessidade de grandes áreas para cultivo de oleaginosas para este fim (WANG *et al.*, 2011).

Dentro desse contexto, o presente estudo visa otimizar a produtividade lipídica de microalgas e cianobactérias, cultivando-as em esgoto doméstico e têxtil em escala de laboratório, sob o efeito de fatores, físicos, químicos e biológicos com o objetivo de remover carbono e nutrientes do esgoto e, adicionalmente promover a produção de lipídeos.

2 OBJETIVO

Abaixo segue detalhado, os objetivos pretendidos para este trabalho, a partir de três experimentos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Cultivar de microalgas e cianobactérias para tratamento de efluentes doméstico e têxtil, a fim de promover o aumento da biomassa celular e o acúmulo de lipídios intracelulares para produção de biodiesel.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar os efeitos da relação C:N e densidade microbiana no aumento da biomassa e no acúmulo de lipídios intracelular em microalgas cultivadas em efluentes domésticos tratados e não tratados.
- b) verificar variações no crescimento da biomassa e acúmulo de lipídeos intracelular de microalgas sob condições de cultivo autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico e sob diferentes regimes de fase clara e escura.
- c) avaliar o potencial de cianobactérias suspensas e imobilizadas, submetidas a diferentes fontes de carbono, relação C:N, incidência de luz e oxigenação do meio; para o tratamento de efluentes têxteis, crescimento da biomassa e acúmulo de lipídios intracelular para produção de biodiesel.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

De acordo com a bibliografia especializada, seguem abaixo as definições dos principais termos utilizados neste trabalho.

3.1 MICROALGAS: ASPECTOS GERAIS

Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que podem sintetizar ácidos graxos (lipídeos) no interior de suas células a partir de fontes de carbono como glicose, acetato, glicerol, CO₂ e outros. A composição, estrutura e teor dos lipídeos acumulados no interior das células, dependem da espécie da microalga, condições de crescimento, estresse a qual estar sujeita e o tipo de metabolismo (autotrófico, heterotrófico ou fotoheterotrófico) (XU *et al.*, 2006).

No crescimento autotrófico, a luz do dia é utilizada preferencialmente como fonte de energia, a qual é convertida em energia química por meio da fotossíntese; entretanto, grande parte da biomassa produzida durante o dia, é perdida no período noturno, devido a respiração. Para evitar perdas da biomassa dos cultivos autotróficos, é comum utilizar de iluminação artificial no período noturno (CHISTI, 2007).

Muitas microalgas podem crescer e acumular lipídeos heterotroficamente, utilizando fontes de carbono externas, em vez da fotossíntese. No cultivo heterotrófico, a fonte orgânica são geralmente açúcares, especialmente a glicose, por ser de fácil assimilação; porém, outras fontes orgânicas também são utilizadas, como glicerol e acetato. Estes sistemas tem alto grau de controle de crescimento, já que a densidade celular é baixa, o que facilita a colheita e diminui seus custos (CHEN *et al.*, 2006; MIAO e WU, 2006; XU *et al.*, 2006; LIANG *et al.*, 2009; HEREDIA-ARROYO *et al.*, 2010; O'GRADY; MORGAN, 2011).

O metabolismo fotoheterotrófico caracteriza-se pela capacidade que algumas microalgas têm de realizar tanto processos autotróficos como heterotróficos para o crescimento da biomassa e acúmulo de lipídeos. Neste metabolismo, cerca de 25% da biomassa final produzida durante o dia, é perdida no período da noite, devido a respiração, que consome energia. Entretanto, o uso de iluminação artificial neste período diminui as perdas (ZHANG, *et al.*, 1999).

3.2 TÉCNICAS DE CULTIVO MASSIVO DE MICROALGAS

A produção de biodiesel a partir de microalgas vai depender da quantidade de biomassa e do conteúdo lipídico estocado intracelularmente, o que está relacionado com a técnica de cultivo empregada. Dentre as técnicas comumente utilizadas, destaca-se os sistemas de fotobiorreatores fechados, lagoas abertas, lagoas de alta taxa e sistemas híbridos.

3.2.1 Fotobiorreatores fechados

Os fotobiorreatores fechados, particularmente quanto à produtividade de biomassa, podem gerar um volume maior de cepas, devido ao maior controle das condições físicas, químicas e biológicas. No entanto, os custos de construção e manutenção desses reatores são muito elevados, limitando seu uso para o crescimento de microalgas e produção de biocombustíveis em larga escala (LEHR *et al.*, 2009). Os fotobiorreatores favorecem, principalmente, a diminuição da contaminação biológica das culturas (HUANG *et al.*, 2010; (MATA *et al.*, 2010).

3.2.2 Lagoas abertas

Já os sistemas naturais, como lagoas abertas, têm baixo custo de construção, são de fácil operação e demandam pouco gasto com manutenção. Quando são utilizados tanques para a construção dos sistemas, estes são compostos por canais de recirculação independentes, e a mistura é realizada por um sistema de pás mecanizadas (MATA *et al.*, 2010). Por outro lado, esses sistemas também apresentam desvantagens, principalmente a possibilidade de contaminação biológica do meio, devido a fatores externos, e a energia empregada para movimentação dos rotores das pás, utilizadas na mistura do cultivo no sistema. Porém, o retorno energético que essas lagoas promovem, supera em muitas ordens de grandeza o investimento aplicado na construção, operação e manutenção do sistema (PARK; CRAGGS, 2010).

3.2.3 Lagoas de alta taxa

As lagoas de alta taxa (LAT's) foram desenvolvidas para o cultivo de microalgas, e são uma adaptação das lagoas de estabilização utilizadas no tratamento de efluentes em geral, as quais foram instalados um sistema de mistura simples, tipo pás de moinho, chamado de “*baffles*” Este tem a função de controlar o fluxo hidráulico dentro da lagoa, aumentando a

eficiência e reduzindo a sua área, otimizando a disponibilidade de oxigênio através da fotossíntese. As lagoas de alta taxa têm a forma de um canal de pequena profundidade onde ocorre movimentação contínua em circuito fechado. Esse sistema é considerado um processo de tratamento de baixo custo que, maximizando a utilização da energia solar, possibilita maior absorção dos nutrientes dos esgotos pelas microalgas levando a maior produtividade e acúmulo de lipídeos intracelular (FALLOWFIELD *et al.*, 1996).

Outras vantagens associadas as lagoas de alta taxa, é o tratamento de efluentes, pois promove: (i): pouca acumulação de lodo, (ii) excelente tratamento a nível terciário dos efluentes, (iii) ausência de odor, e (iv) mosquitos (ORON; SHELEF, 1982). Adicionalmente, também é obtido baixas concentrações de matéria orgânica efluente (DQO) ($25 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) e remoção de organismos patogênicos (ORAN, 1989).

3.2.4 Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos operam em duas fases distintas, a primeira consiste na produção de biomassa microalgal em fotobiorreatores com um meio de cultura rico em nutrientes e condições abióticas e bióticas controladas; e a segunda consiste na operação de lagoas abertas, onde a biomassa produzida na fase 1 é submetida a estresses ambientais, como deficiência de nitrogênio, fósforo e alta luminosidade (HUNTLEY *et al.*, 2007).

3.3 PARÂMETROS QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE MICROALGAL

São os seguintes os parâmetros que afetam a produtividade microalgal:

3.3.1 Luz

Quando há limitação nutricional, a fotossíntese microalgal aumenta com a intensidade da luz, e cessa quando a biomassa microalgal atinge o crescimento máximo, o qual corresponde ao ponto de saturação da luz. Aumentar a intensidade da luz além deste ponto, pode comprometer os receptores de luz das microalgas, e com isso a absorção da luz, devido ao processo denominado foto inibição. Isto leva a diminuição da sua capacidade fotossintética, e consecutivamente a diminuição do crescimento da biomassa microalgal e acúmulo de lipídeos (BOUTERFAS *et al.*, 2002; MACEDO *et al.*, 2002; TORZILLO *et al.*, 2003; RICHMOND *et al.*, 2003; RICHMOND, 2004).

Oh *et al.* 1997, observaram uma redução nas concentrações de carboidratos, nitrogênio e fósforo, nas células de cultivos de microalgas que foram expostas por um longo período de tempo a intensidades luminosas de 25 a 72 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kojima e Zhang, (1999), em seus estudos, constataram que aumentos significativos da biomassa microalgal, produzida em cultivos de microalgas sob intensa iluminação, só ocorreu em cultivos de microalgas já adaptadas a essa condição.

A alta produtividade de biomassa microalgal, tende a cobrir toda a superfície da área de cultivo, o que causa um sombreamento nesta. Isto impede que a luz alcance as microalgas que estão a maiores profundidades, diminuindo o processo fotossintético destas microalgas e consecutivamente a produtividade (PARK *et al.*, 2011).

3.3.2 Fontes de carbono

A assimilação de compostos de carbono pelas microalgas é essencial para o aumento da sua produtividade e acúmulo de lipídeos, assim como a assimilação de nutrientes e absorção de luz. A fonte de carbono utilizado pelas microalgas tem relação com o tipo de metabolismo desenvolvido por elas. As microalgas que desenvolvem o metabolismo autotrófico, assimilam preferivelmente carbono inorgânico, por meio da fotossíntese, que pode ser o CO_2 atmosférico, bicarbonatos dissolvidos no meio e em segundo plano, também uma parcela de carbono orgânico dissolvido no meio (BRENNAN, 2010; FRANCO, 2013).

Entretanto, a assimilação de carbono a partir de carbonatos são exclusivas das espécies de microalgas que apresentam atividade da enzima carbono *anidrase*, que libera o carbono dos carbonatos dissolvidos no meio (HCO_3^-) na forma de CO_2 .

O metabolismo heterotrófico, caracteriza-se, dentre outros fatores, pela utilização do carbono orgânico de fácil assimilação, tais como glicose, acetato, glicerol, ou outras fontes de fácil assimilação que estejam dissolvidos no meio. Em segundo plano consomem carbono inorgânico. As microalgas que desenvolvem o metabolismo fotoheterotrófico, por terem características dos processos autotróficos e heterotróficos, utilizam compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de carbono (BRENNAN, 2010; FRANCO, 2013; WANG *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2013).

3.3.3 Nutrientes

Nutrientes são compostos indispensáveis ao crescimento microalgal, os quais estão presentes nos efluentes domésticos nas formas orgânicas e inorgânica. A própria biomassa microalgal possui uma relação N:P variando de 4:1 a 40:1, dependendo da espécie e da disponibilidade de nutrientes no meio. O nitrogênio é um dos principais fatores para regular o acúmulo de lipídios nas células das microalgas.

Limitando o nitrogênio disponível para as microalgas, o acúmulo de lipídeos é estimulado, e pode ser superior a 40%. Entretanto, o crescimento das microalgas é afetado negativamente. Isso acontece pelo fato de o nitrogênio ser essencial na composição dos aminiácidos e formação de proteínas, dessa forma, estando esse nutriente limitado, as células microalgais também limitam o seu crescimento pela impossibilidade de formação de proteínas, e canalizam a energia disponível para a acumulação de substâncias capazes de prover a energia necessária para a célula numa possível escassez total do nutriente.

No entanto, ainda assim é possível obter mutuamente alto acúmulo de lipídeos e alta produtividade migroalgal, desde que se conheça a curva e as taxas de crescimento e produtividade diárias do cultivo. De forma bem administrada, o cultivo de microalgas é uma excelente alternativa para o tratamento de efluentes domésticos, ainda que nestes a relação N:P seja extremamente baixa, para a remoção de matéria orgânica e acúmulo de alto teor de lipídeos intracelular para produção de biodiesel (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHELF, 2010; CHISTI, 2008; PARK *et al.*, 2011).

3.3.4 Temperatura

O aumento da temperatura leva ao aumento da produtividade microalgal, entretanto, um aumento acima da temperatura ótima leva a uma diminuição da produtividade, devido ao aumento da respiração e fotorrespiração das microalgas, ou mesmo a desnaturação das proteínas.

A temperatura ótima é medida no momento da máxima taxa de crescimento sobre condições ideais de nutrientes e luz. A temperatura ótima para muitas espécies de microalgas é entre 28 e 35 °C. Entretanto, variações acentuadas na temperatura pode diminuir a produtividade das microalgas, pelo fato da não adaptação prévia das cepas a mudanças bruscas de temperatura (PULZ, 2001; SOEDER *et al.*, 1985; TILLET, 1988).

Harris (1978), estudou o efeito de mudanças bruscas de temperatura na taxa de produtividade de microalgas adaptadas a altas temperaturas e observou que quando a cultura foi submetida a temperatura de 10 °C a concentração de clorofila-*a* decresceu 50% em 15h.

Outros trabalhos apontam que a temperatura ótima para a maior produtividade microalgal está entre 20 e 30 °C, podendo muitas espécies suportarem variações de temperatura de até 15 °C abaixo do valor ótimo. Entretanto, variações de 2 a 4 °C acima da temperatura ótima pode inativar e desnaturar as enzimas metabólicas das microalgas, podendo ocasionar a perda do cultivo para culturas não adaptadas (BRENNAN e OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; MATA *et al.*, 2010).

3.3.5 Competição com outros micro-organismos

O crescimento de microalgas em efluentes domésticos e industriais tratados ou não por outras tecnologias biológicas (tratamento anaeróbio e/ou aeróbio) têm tido implicações negativas, tais como a redução da produtividade de microalgas devido a patógenos e/ou acúmulo de inibidores metabólitos (MOHEIMANI e BOROWITZKA, 2006).

Protozoários herbívoros e o zooplâncton podem reduzir a produtividade das microalgas a níveis extremamente baixos em alguns dias, por exemplo, rotíferos e cladóceros em densidades maiores que 105 mg.L⁻¹, chegam a reduzir a produtividade das microalgas em 90% em 2 dias (BENEMANN, 2008a; VAN HARMELEN e OONK, 2006). Cauchie *et al.* (1995), quantificaram durante vários dias, uma redução de 99% na síntese de clorofila-*a*, quando da presença de *Daphnias*. Isso ocorre pelo fato de as microalgas servirem de alimento para esses organismos.

O parasitismo por fungos e a infecção viral também podem reduzir significativamente a população e diversidade das microalgas no meio em alguns dias, pois desencadeiam alterações na estrutura das células das microalgas comprometendo sua diversidade e sucessão (KAGAMI *et al.*, 2007).

3.4 REPRODUÇÃO E CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Para determinar a variação do crescimento da biomassa microalgal com o tempo de cultivo, métodos diretos, como a contagem de células, e indiretos, como a densidade óptica, a fluorescência *in vitro*, a determinação do peso seco, a concentração de clorofila-*a* e carbono são

comumente utilizados. Para determinar a variação do crescimento da biomassa microalgal é necessário conhecer as condições do cultivo e o intervalo da variação do crescimento com o tempo que pode ser detectada. Com base nesses conhecimentos são planejadas as coletas de amostras, que incluem amostragens em regime nictmeral (ciclo diário), para avaliar os componentes sintetizados em curtos intervalos de tempo, e diárias. As coletas diárias devem ser, de preferência, realizadas no mesmo horário, para minimizar a dispersão dos dados temporais. Para o caso em que se conhece o período da duplicação celular, é importante evitar a medição neste período, devendo ser realizada antes ou depois da duplicação. Quando não se conhece o período de duplicação celular da microalga, estudos preliminares devem ser realizados para determinar o padrão da divisão celular, por exemplo, análises em regime nictimeral (LOURENÇO, 2006)

A determinação do crescimento da biomassa microalgal por densidade óptica consiste inicialmente na correta seleção do comprimento de onda, pois as microalgas possuem pigmentos fotossintetizantes, cuja absorção ocorre entre 600 e 800nm. Também é necessário relacionar as medidas de absorvância com as de peso seco das amostras de microalgas, uma vez que a determinação do crescimento da biomassa microalgal baseada no peso seco é amais adequada, pois a umidade provoca erro significativo nas medidas (LOURENÇO, 2006).

As coletas de amostras para avaliar a taxa de crescimento da biomassa microalgal devem ser realizadas ao menos três vezes, no início do crescimento exponencial e no período de transição para a fase estacionária; logo, é necessário um conhecimento prévio da velocidade com a qual o número de células está variando, determinada a partir de uma pequena quantidade de inoculo, capaz de promover, no mínimo, 5 gerações de crescimento (WOOD *et al.*, 2005).

Guillard, (1973), *apud* WOOD *et al.* (2005), descreveu um modelo matemático para calcular o crescimento de microalgas no período exponencial em cultivos em batelada (Equação 1), na qual a taxa de aumento de células por unidade de tempo é proporcional ao número de células presentes na cultura no instante de tempo inicial.

$$\ln N_t = \ln N_0 + rt \quad (1)$$

Onde: N_t é o tamanho da população em um dado momento qualquer do tempo (t), N_0 o da população inicial e a taxa de crescimento.

Com o tempo (t) em dias, e dividindo a taxa de crescimento (r) pelo logaritmo natural de 2 (0,6931) tem-se o número de duplicações por dia (k) (Equação 2).

$$k = r/0,6931 \quad (2)$$

Por convenção, k refere-se a duplicações celulares diárias, uma vez que t é expresso em dias ou frações de dias. Se incrementos de tempo menores que um dia forem utilizados no cálculo, não será possível afirmar que a taxa de crescimento calculada por dois pontos consecutivos, será a mesma ao longo de um dia, pois mesmo culturas cultivadas sob luz contínua, podem mostrar ritmos diários de divisão celular, que devem ser determinadas em mais de um ciclo diário. Sendo assim, o tempo de duplicação (T_2) da cultura pode ser calculado a partir de uma estimativa de r (Equação 3), com o resultado expresso na mesma unidade de tempo (GUILLARD, 1973, apud WOOD, *et al.*, 2005).

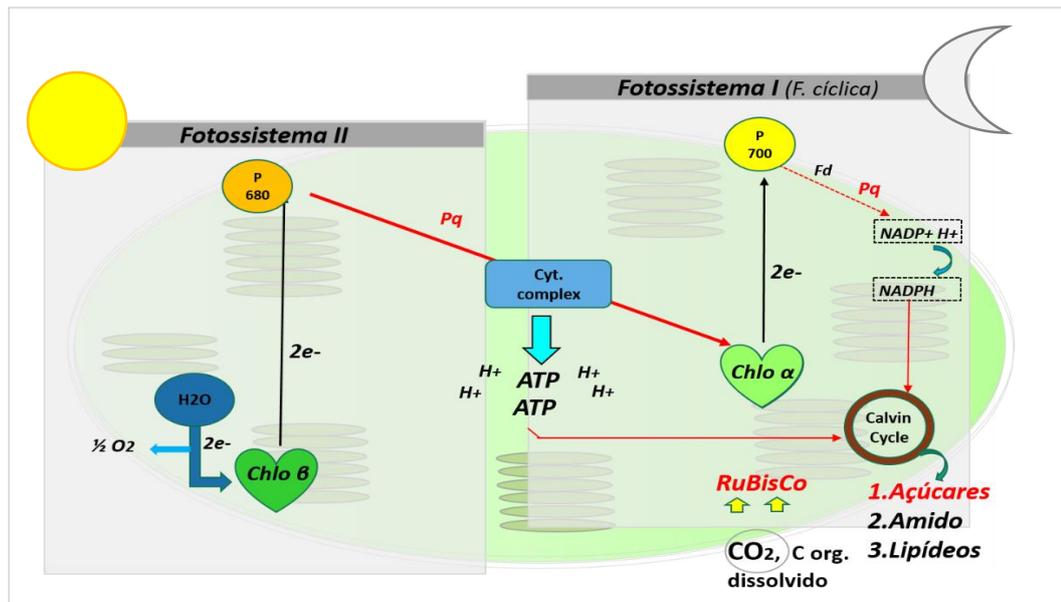
$$T_2 = 0,6931/r \quad (3)$$

3.5 SÍNTESE DE LIPÍDEOS E FOTOSSÍNTESE NAS MICROALGAS

Nos sistemas biológicos, os lipídeos funcionam como componentes da membrana, produtos de reserva, metabólitos e fonte de energia, sendo majoritariamente constituído de ácidos graxos. Os lipídeos se classificam em: (i) neutros, (ii) polares, (iii) triacilgliceróis (TAG), (iv) fosfolipídeos, (v) glicolipídeos, e (vi) esteróis. A síntese dos ácidos graxos nos vegetais fotossintéticos e microalgas ocorre no estroma do cloroplasto, onde a coenzima NADPH é produzido pelas reações da fotossíntese (NELSON; COX, 2002).

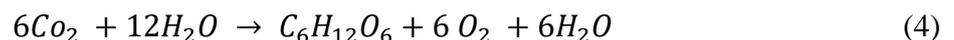
Para se entender melhor a síntese de lipídeos na célula microalgal, se faz necessário a compreensão da fotossíntese numa célula vegetal. Na Figura abaixo, tem-se um esquema sucinto da fotossíntese na célula.

Figura 1 - Esquema simplificado da fotossíntese

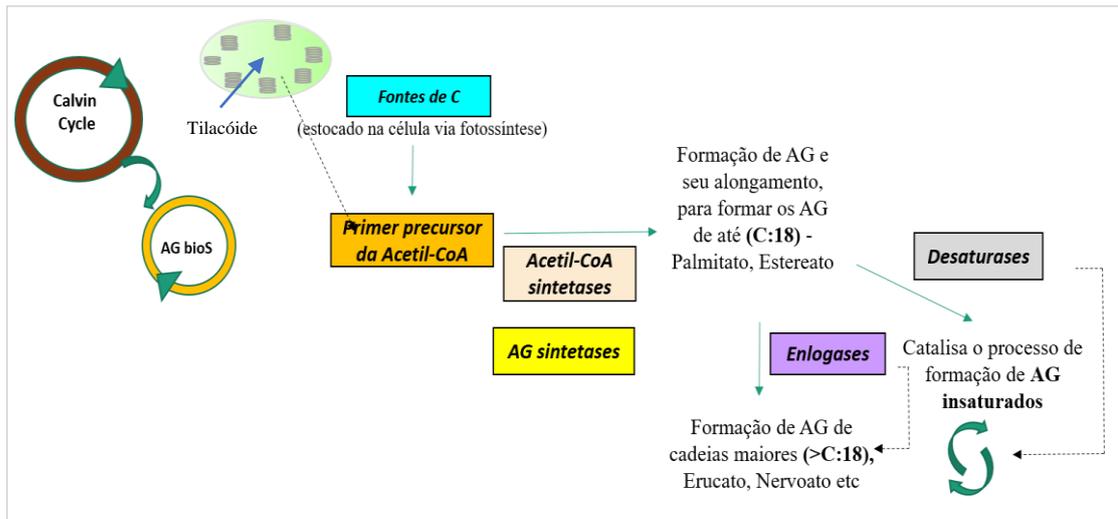


Fonte: A Autora (2019).

A formação de cada composto no interior da célula da microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Em microalgas verdes, por exemplo, o complexo sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenoide, captura os fótons da energia solar. Esta energia é utilizada pelo fotossistema na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e O_2 . Os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para formação do NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do tilacóide, o qual conduz a produção de ATP via *ATP sintase*. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO_2 é fixado em moléculas com três átomos de carbono, assimiladas em açúcares, amido, lipídeos, ou outras moléculas necessárias ao crescimento celular. Já o substrato para a *hidrogenase*, H^+ e e^- , são supridos tanto via cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos, como via fermentação do amido armazenado (BEER *et al.*, 2009). A fórmula global da fotossíntese é descrita na equação a seguir:



Na Figura abaixo, tem-se de forma sucinta, o processo de formação de lipídeos no interior da célula microalgal durante a fase escura da fotossíntese.

Figura 2 - Síntese lipídica na fotossíntese.

Fonte: A Autora (2019).

A fração lipídica das microalgas é composta por triglicerídeos e ácidos graxos saturados, insaturados e poli-insaturados, alguns deles das famílias ω -3 e ω -6. Os ácidos graxos poli-insaturados não são muito utilizados na produção de biodiesel, pois são propensos a reações de oxidação indesejáveis pois torna a produção de biodiesel impraticável. As características dos ácidos graxos que compõem os lipídeos microalgais devem ser levadas em consideração, porque as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção, dependem fortemente delas. A rota de formação dos ácidos graxos consiste na formação da acetil coenzima A (acetil-coA) no citoplasma e o alongamento e insaturação da cadeia carbônica pelo sistema enzimático acetil-coA *carboxilase* (ACCE)/ ácido graxo *sintase* (FAS); e a dos triglicerídeos pelas enzimas L- α -fosfoglicerol e acetil-coA, principais iniciadores do processo (*primers*) (HU *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2010).

O conteúdo de óleo em microalgas pode atingir 75% em peso em relação à biomassa seca, mas com baixa produtividade, como em *Botryococcus braunii*, por exemplo. Algas mais comuns como *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Cylindrotheca*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nannochloropsis*, *Neochloris*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* acumulam níveis de óleo entre 20 e 50%, mas produtividades maiores podem ser atingidas, dependendo do processo de fixação do carbono para a produção de ácidos graxos e triglicerídeos, que pode ser controlada e otimizada por variações nas condições de crescimento e estresse nutricional (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2011; MATA *et al.*, 2010).

3.6 OPTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO LIPÍDICA POR MICROALGAS

A biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídeos. Sabe-se que para constituir matéria-prima de biodiesel, a microalga deve ser rica em ácido graxo, por exemplo, uma microalga com um teor de proteínas muito alto e baixo teor de lipídeos, esta, não seria útil como matéria-prima para biodiesel. Geralmente, a produção de lipídeos é inversamente proporcional à atividade fotossintética, que pode sofrer redução por diversos estresses. Segundo Becker, (1994), a produção máxima de triglicerídeos pode ser obtida em 2 fases: (i) crescimento exponencial em condições ótimas e (ii) aplicação de algum tipo de estresse (p.e., escassez de nutrientes). Formas de otimizar esse processo em duas fases é o principal objetivo a ser alcançado para aumentar a viabilidade econômica desta tecnologia (BENEMANN, 1994).

O tempo de detenção e o regime hidráulico a qual o cultivo é submetido são aspectos importantes a serem estudados para otimizar a produção de biomassa e rendimento lipídico, pois interferem diretamente no metabolismo de síntese e estocagem lipídica. O metabolismo de lipídeos, sob considerável estresse ambiental, como deficiência de nitrogênio, mostra que o carbono fixado é incorporado em compostos altamente energéticos e, portanto, há uma competição entre a síntese de carboidratos e lipídeos. Em condições em que há deficiência de nitrogênio, ocorre a diminuição do conteúdo proteico e o aumento de compostos ricos em energia, como lipídeos e carboidratos. O segundo é o primeiro a ser sintetizado como fonte energética de reserva, seguido dos lipídeos, que são fontes energéticas de reserva de longo prazo, para o caso de estresse ambiental prolongado. (BENEMANN, 1994; SIAUT *et al.*, 2011).

Chen *et al.* (2011), observaram uma alta correlação entre o tipo e a quantidade dos compostos de reserva mais energéticos com a duração do período de deficiência de nitrogênio; e Ho *et al.* (2011), sugeriram que a duração do período de baixa disponibilidade de nitrogênio pode ser um importante indicador e parâmetro operacional para otimizar a produção e o acúmulo de lipídeos.

Benemann *et al.* (1996), demonstraram que um aumento da intensidade luminosa, após o início da deficiência de nitrogênio na cultura, resulta em um aumento significativo da produtividade de lipídeos, maior que em culturas mantidas sob intensidades luminosas constantes.

De acordo com Hu *et al.* (2008), a composição dos ácidos graxos dos triglicerídeos de diversas espécies de microalgas e cianobactérias é significativamente influenciada pela temperatura, a qual favorece a síntese de ácidos graxos insaturados quando diminuí e saturados quando aumenta.

A concentração de CO₂ também influencia a produção lipídica e de ácidos graxos nas microalgas, e está relacionada com as necessidades nutricionais. A produção de ácidos graxos foi avaliada em cultivos autotróficos a partir de variações da: (i) combinação da concentração de CO₂ com a intensidade luminosa (CARVALHO e MALCATA, 2005), (ii) aumento da concentração de CO₂ (MURADYAN *et al.*, 2004), (iii) aumento da temperatura (COLLA *et al.*, 2004), (iv) uso de nutrientes derivados de C, N e S em fase gasosa (RADMANN; COSTA, 2008), (v) diferentes concentrações de CO₂ (Morais e Costa, 2008), e (vi) diferentes temperatura e concentração de NO₃ (COSTA *et al.*, 2006b).

Algumas espécies de microalgas têm seu crescimento/produzividade otimizada na presença de bactérias. Estas enriquecem o meio com CO₂, uma importante fonte de carbono para o cultivo autotrófico de microalgas, ao degradar a matéria orgânica durante o metabolismo celular (BRENNAM *et al.*, 2010). No entanto, estudos também apontam que a presença de algumas bactérias fermentadoras é desfavorável, pois tendem a competir com as microalgas pelo carbono dissolvido no meio, e até mesmo utilizar a biomassa microalgal como fonte de energia em seus processos bioquímicos, diminuindo a densidade das microalgas, e tornando-se os micro-organismos dominantes no meio de cultivo (BAHADAR *et al.*, 2013); mas essa dominância irá depender de muitos fatores, como por exemplo, a densidade inicial do inóculo no efluente e condições de iluminação que o cultivo está sujeito (BRENNAM *et al.*, 2010). Diante disso, existem questões em aberto no que diz respeito ao rendimento final de lipídios nos cultivos puros e em consórcio, sendo este um aspecto relevante para experimentação. Assim, estudos mais aprofundados acerca do consórcio alga-bactérias são necessários para elucidar esta questão.

O aumento da densidade da biomassa microalgal também foi observada agregando espécies de *Chlorophyta* em consórcio alga-alga, utilizando efluente doméstico como fonte de nutrientes e carbono. Uma alta densidade de microalgas foi alcançada em poucos dias de cultivo, o que foi atribuído à interação entre as diferentes espécies de microalgas, o que favoreceu um aumento da velocidade de captura de carbono e nutrientes do meio, maximizando o rendimento final de lipídeos intracelulares (WANG *et al.*, 2011). No entanto, Pires *et al.*

(2013), defendem que a coexistência de espécies não competidoras no mesmo cultivo pode ser mais vantajosa na obtenção de altas densidades de biomassa e alta produtividade lipídica.

3.7 PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS A PARTIR DOS LIPÍDEOS INTRACELULARES DAS MICROALGAS

A produção de biocombustível a partir de microalgas tem como principais vantagens: (i) não competir por áreas agricultáveis, (ii) não necessitar de agrotóxicos e consumo excessivo de água, (iii) apresentar altas taxas de crescimento da biomassa com elevado teor lipídico intracelular (essencial à produção de biocombustível), em geral, maiores que algumas culturas oleaginosas, (iv) possibilidade de cultivo em áreas impróprias para agricultura, e (v) efluentes domésticos e industriais, no qual, as microalgas utilizam o carbono e os nutrientes dissolvidos no metabolismo. Logo, esta prática contribui também para o tratamento de águas residuais (GOUVEIA, 2009). Na Tabela 1 tem-se um comparativo da produção de óleo e a área utilizada para o cultivo de oleaginosas e microalgas para produção de biodiesel (CHISTI, 2007).

Tabela 1 - Produção de óleo e área para cultivo de oleaginosas e microalgas para produção de biodiesel.

Cultura	Óleo (L.ha⁻¹)	Área (ha⁻¹)
Milho	172	1540
Soja	446	594
Canola	1190	223
Jatropha	1892	140
Coco	2689	99
Palma	5950	45
Microalga ^a	136.900	2
Microalga ^b	58.700	4,5

Fonte: A Autora (2019).

a = Espécie de alto potencial: 70% de óleo em peso seco e b = Espécie de baixo potencial: 30% de óleo em peso seco. Fonte: Chisti (2007).

As microalgas podem ser capazes de atender a demanda global de combustíveis renováveis, pois a produtividade de óleo de muitas microalgas excede a produtividade de óleo das melhores culturas oleaginosas. Algumas espécies de microalgas podem estocar até 100 vezes mais óleo do que o mesmo conteúdo em biomassa seca de uma espécie vegetal de grande porte (CHISTI, 2007). As microalgas também apresentam a vantagem de crescerem muito mais rápido que culturas terrestres, contribuindo para uma produção de óleo mais rápida. Durante a fase de pico de crescimento, algumas espécies de microalgas podem duplicar-se a cada 3,5 h em média, havendo casos de tempos ainda mais curtos. Assim, o fato de as microalgas crescerem de forma acelerada, é mais um aspecto positivo para seu uso em diversos setores

econômicos, especialmente na produção de biocombustíveis (DE PAUW, 1984). Na Tabela 2 tem-se a composição bioquímica de algumas espécies de microalgas e cianobactérias.

Tabela 2 - Composição bioquímica de diferentes espécies de microalgas e cianobactérias.

Espécie	% em peso seco			
	Proteínas	Carboidratos	Lipídeos	Ac. nucléicos
<i>Scenedesmus obliquos</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1,9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamidomonas reinhardii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	57	16	25	-
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesio Parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4,5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-
<i>Botryococcus braunii</i>	40	20	35	-
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	45	25	35	-
<i>Oscillatoria sp.</i>	45	20	17-20	-

Fonte: Becker (1994).

3.8 EXTRAÇÃO LIPÍDICA DAS MICROALGAS

O rompimento da parede celular e a extração dos componentes intracelulares das microalgas e cianobactérias são comumente realizadas por prensagem, choque osmótico, ultrassom, solventes orgânicos, reações alcalinas e enzimáticas. A extração por ultrassom é utilizada para obter os componentes intracelulares de pequenas quantidades de biomassa suspensa; o tratamento com álcalis também é um método efetivo para a ruptura da parede celular e isolar ácidos graxos livres. O uso de enzimas é outro método de extração eficaz, que torna o fracionamento do óleo mais fácil, porém tem um alto custo, comparado com os demais métodos. Além destes métodos, a tradicional prensagem e choque osmótico também são usados para o rompimento da parede celular, embora ecologicamente e economicamente viável, nem sempre são eficientes, sendo utilizados como pré tratamento, para posterior extração por um método mais eficiente (GRIMA *et al.*, 2003; MATA *et al.*, 2010).

3.9 PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DE LIPÍDEOS INTRACELULARES DAS MICROALGAS

O biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, produzido pela reação de um óleo ou gordura com um álcool na presença de um catalisador. O biodiesel pode ser usado puro ou em misturas com o diesel em motores a diesel. Como combustível, ele é considerado menos poluente que os combustíveis derivados do petróleo, pois são renováveis, biodegradáveis, não tóxico e isento de enxofre e compostos aromáticos (AMARO *et al.*, 2011).

O biodiesel pode ser derivado de materiais biológicos, incluindo matéria orgânica não fossilizada e metabólicos de organismo vivos, como, por exemplo, óleo de armazenamento vegetal. Tradicionalmente o biodiesel é produzido através das reações de transesterificação de triglicerídeos, usando geralmente catalisadores alcalinos, ou da esterificação de ácidos graxos, os quais são submetidos à reação direta com um álcool na presença de catalisadores ácidos sobre aquecimento (DERMIBAS, 2009; RAWAT *et al.*, 2011).

Até o momento, existem biocombustíveis de 1º, 2º e 3º geração, que estão em constante evolução, em decorrência do desenvolvimento de pesquisas em botânica e biotecnologia, que vem trazendo avanços na área de biocombustíveis.

Os de 1º geração são produzidos a partir de espécies vegetais oleaginosas de grande porte, também utilizadas como espécies alimentícias. Este fato tem ocasionado uma série de controvérsias, principalmente devido ao seu impacto sobre os mercados globais de alimentos e a segurança alimentar em várias partes do mundo. Os de 2ª geração utiliza açúcares, amido ou óleos de espécies alimentares, semelhante aos de 1º geração, com o adicional da utilização de biomassa à base de lignina e celulose, ou seja, grama, árvores, resíduos agrícolas e industriais que podem ser convertidos através de uma rota bioquímica ou termoquímica (BUCKERIDGE *et al.*, 2010; MATA, 2010).

Os biocombustíveis de 3ª geração têm seus avanços baseados em pesquisas realizadas na produção de biomassa. Existem progressos significativos e extremamente eficientes no campo da genômica vegetal e técnicas de reprodução e otimização de subprodutos, que podem resultar em plantas e microalgas com propriedades que as tornam mais apropriadas para a conversão em bioprodutos. As microalgas têm se destacado nesse campo, sendo a chave das pesquisas para produção de biocombustíveis de 3ª geração (HARUN *et al.*, 2010). Segundo

BOER *et al.* (2012), avanços no desenvolvimento de tecnologias que transformam o óleo de microalgas em biodiesel, estão surgindo como resposta as dificuldades de escalonamento da produção do biodiesel de 1ª e 2ª geração. Considerando a produção de óleo vegetal e gordura em todo o mundo, o biodiesel produzido a partir destas matérias-primas não fornecer 10% da demanda mundial de diesel, os quais também são utilizados em diversos ramos industriais, por exemplo, a alimentícia.

3.10 TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS DOMÉSTICAS E INDUSTRIAIS POR MICROALGAS

Efluentes de tratamento secundário de esgoto, ainda contém altas concentrações de nutrientes (nitrogênio e fósforo), portanto, antes do lançamento nos corpos receptores, eles devem receber um tratamento complementar, para reduzir suas concentrações a níveis de lançamento prescritos por legislações ambientais. Neste contexto, tem sido amplamente estudado espécies de microalgas que podem crescer satisfatoriamente em condições onde o nitrogênio e fósforo estão em altas concentrações, comuns a muitas águas residuais (ARBIB *et al.*, 2012). O cultivo de microalgas nestes efluentes é explorado não apenas para remover estes nutrientes e o dióxido de carbono gerado no tratamento de águas residuais, mas também para a produção de biomassa microalgal, a qual pode acumular lipídeos, essencial para a produção de biodiesel (UNNITHAN *et al.*, 2014).

As microalgas também podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais, por exemplo, efluentes da indústria têxtil. Nestes efluentes são encontrados sais, sulfatos e corantes sintéticos, que lhe atribuem cor e toxicidade. Estes são geralmente obtidos a partir do carvão mineral e produtos petroquímicos. Normalmente são compostos aromáticos e heterocíclicos, podendo formar mais de 500 intermediários durante o processo de degradação, por vezes mais tóxicos que os próprios corantes, por exemplo, aminas aromáticas, composto altamente carcinógeno (UNNITHAN *et al.*, 2014).

Dentre os corantes sintéticos, 70% são utilizados no tingimento de peças têxteis, dos quais destacam-se os do tipo azo (VAN DER ZEE, 2002). Estes tem em sua estrutura química um ou mais grupos azo ($-N=N-$), ligados a anéis benzênicos ou naftalenos, podendo conter elementos e diversas funções químicas, como cloro ($-Cl$), metil ($-CH_3$), nitro ($-NO_2$), amina ($-NH_2$), hidroxila ($-OH$), carboxila ($-COOH$) e sulfonato ($-SO_3H$). Este último grupo é o mais comum, o que define o corante como um azo sulfonado. Os grupos sulfônicos quando ligados

a aminas aromáticas, aumentam o caráter xenobiótico do composto, e a presença de unidades aniônicas fortemente carregadas impede sua passagem através da membrana celular bacteriana, dificultando a sua degradação (VAN DER ZEE, 2002).

Bactérias anaeróbias em sua maioria não conseguem degradar naftalenos sulfonados, ou o degradam de forma incompleta. O grupo sulfônico, como substituinte em aromáticos, raramente ocorre na natureza, o que torna estes compostos resistentes a biodegradação. Estes compostos são particularmente perigosos, por serem mutagênicos, teratogênicos e carcinógenos, e sua eliminação total é de grande importância (NÖRTEMANN *et al.*, 1986; PEREI *et al.*, 2001).

Recentemente, tem-se empregado algumas espécies de microalgas no tratamento de efluentes têxteis. No entanto, a cor, toxicidade e salinidade comum a esses efluentes podem afetar significativamente o crescimento de microalgas, influenciando, sobretudo na produtividade de substâncias de armazenamento, como os lipídeos. A cor do efluente, juntamente com a toxicidade ocasionada por compostos sulfatados, por exemplo, é capaz de reduzir o rendimento fotossintético das espécies, com consecutiva redução da sua taxa de crescimento. A salinidade pode afetar positiva ou negativamente o crescimento das microalgas, dependendo da concentração dos sais e evaporação do meio de cultivo. Essas mudanças podem afetar o crescimento por três vias: estresse osmótico, estresse iônico e mudanças na razão iônica celular (permeabilidade da membrana celular) (MATA *et al.*, 2010).

Estudos também tem abordado o uso de algumas espécies de cianobactérias para o tratamento de efluentes têxteis, e os resultados têm sido satisfatório para a remoção de nutrientes, cor e toxicidade desses efluentes. Dellamatrice *et al.*, (2017), avaliaram a degradação de 3 diferentes corantes presentes em um efluente a partir do metabolismo dos gêneros de cianobactérias *Anabaena*, *Phormidium* e *Chococcus sp*, e constataram que a degradação dos corantes e a remoção de toxicidade foi equivalente ao de um sistema de tratamento aeróbio-anaeróbio. Os pesquisadores concluíram que o uso de cianobactérias no tratamento terciário de efluentes contendo compostos recalcitrantes é uma opção promissora, pois além de remover toxicidade, a biomassa gerada pode ser aproveitada para obtenção de subprodutos com valor comercial agregado, como lipídeos para produção de biodiesel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo segue uma descrição dos materiais e métodos utilizados nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi realizado no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) do Departamento de Engenharia Civil, Centro de Tecnologia e Geociências (CTG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), campus Recife, e no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Engenharias da Akdeniz Universitesi, Antalya, Turquia.

Os estudos para o tratamento de efluentes e obtenção de lipídeos para produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas e cianobactérias em efluentes domésticos e industriais, foram divididos em 3 experimentos independentes, realizados em escala de laboratório.

O efluente doméstico utilizado nos experimentos 1 e 2 foi coletado na estação de tratamento de efluentes do município de Rio Formoso (ETE-Rio Formoso I), localizado a 86 km do Recife, litoral sul de PE. A ETE atende uma população de 15.830 habitantes e está nas coordenadas geográficas 08°39'50'' de latitude sul e 35°09'32'' de longitude oeste; composta por um reator de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB) com volume útil de 324 m³, núcleo principal do sistema, e uma lagoa de polimento com 28.050 m³ seguida de 3 filtros de pedra de 7.920 m³ cada, para o pós tratamento.

4.1.1 Experimento 1: Cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto e tratado

As microalgas no Experimento 1 foram cultivadas em efluente doméstico (afluente ETE) e efluentes das três unidades de tratamento da ETE - Rio Formoso, como descrito na Figura 3.

Figura 3 - Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 1.



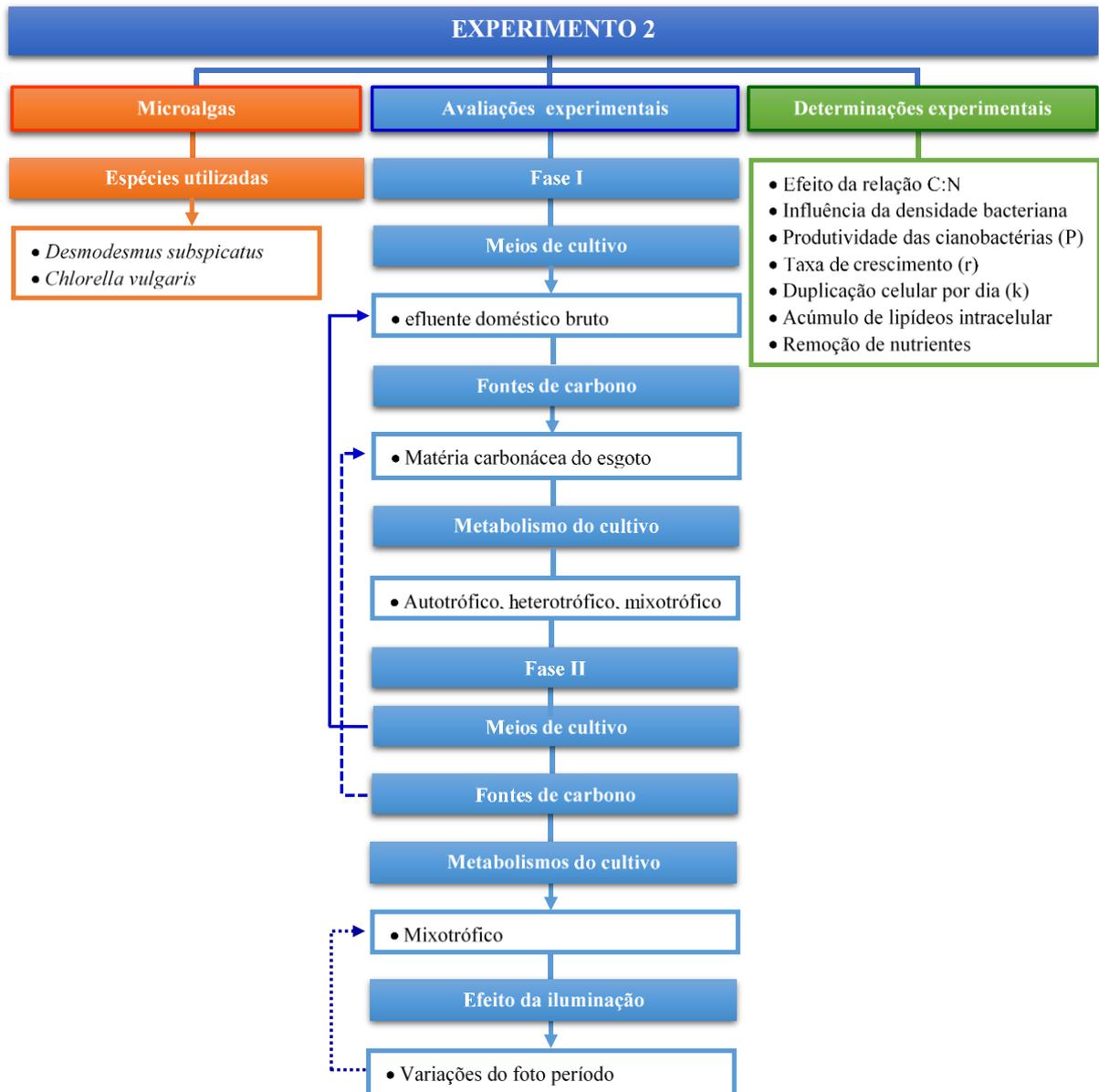
Fonte: A Autora (2019).

C:N – Relação carbono: nitrogênio.

4.1.2 Experimento 2: Cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto

As microalgas no Experimento 2 foram cultivadas em efluente doméstico (afluente ETE - Rio Formoso) em estado bruto (não submetido a nenhum tipo de tratamento). Este foi dividido em 2 fases, nas quais foram avaliados 3 metabolismos de cultivo e o efeito do foto período em um dos metabolismos de cultivo, como descrito na Figura 2.

Figura 4 - Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 2.

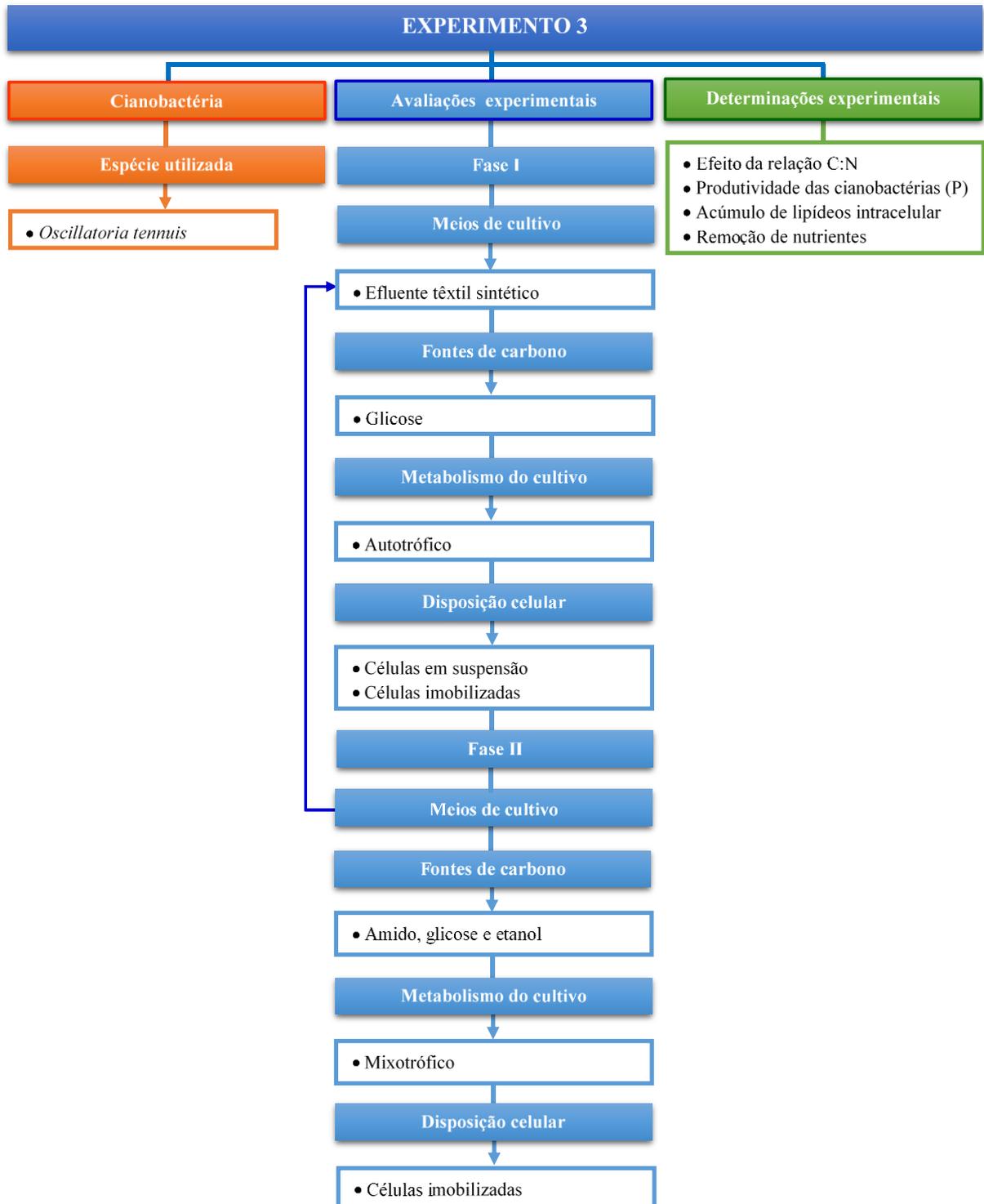


C:N – Relação carbono: nitrogênio. Fonte: A Autora (2019).

4.1.3 Experimento 3: Cultivo de cianobactérias em efluente têxtil sintético

No experimento 3 foi avaliado o potencial de uma cultura de cianobactéria para tratar efluente de indústria têxtil em estado bruto, e sua capacidade de produzir insumos (lipídeos) para produção de biodiesel, o qual foi realizado como descrito na Figura 5.

Figura 5 - Organograma das etapas seguidas para a realização do Experimento 3.



C:N – Relação carbono: nitrogênio. Fonte: A Autora (2019).

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental deste trabalho, desenvolveu-se conforme descrito nos itens a seguir:

4.2.1 Origem das cepas e cultivo das microalgas

As cepas das microalgas *Desmodesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris*, ambas do grupo Chlorophyta, de habitat dulciaquícola, foram provenientes do banco de cepas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo, do Departamento de Engenharia de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LAPAVI-DEPAQ-UFRPE).

4.2.2 Água para preservação das cepas e cultivo inicial das microalgas

Para preservação das cepas e preparação dos cultivos iniciais das microalgas foi utilizado água de abastecimento. No entanto, para eliminar a contaminação ambiental e garantir a permanência das suas características químicas iniciais, foi adicionado dióxido de cloro (ClO_2), o qual agiu por um tempo de contato de 1h na água. Em seguida o íon cloreto (Cl^-) foi removido por aeração, promovida por bombas de aquário, por aproximadamente. Quando a aeração não foi suficiente para eliminar o Cl^- excedente, mesmo aumentando o tempo de aeração para 2h, foi adicionado uma pequena quantidade de tiosulfato de sódio na água (aproximadamente 100 mg), para reduzir a concentração excedente do Cl^- na água, tornando-a própria para o cultivo das microalgas USEPA, (1993). A quantificação dos íons Cl^- foi realizado por meio da adição de 1 gotas do indicador ortotoluidina em 5 ml de água.

4.2.3 Preservação das cepas das microalgas

As cepas foram preservadas em tubos de ensaio de 10 mL tamponados, contendo água clorada, enriquecida com meio de cultivo comercial Provazzoli[®] (PROVAZZOLI 1968), e vitaminas do complexo B (Tabela 3). As culturas puras foram mantidas em uma incubadora com circulação interna de ar (Caltec mod. El-08F1-AF), temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação constante com intensidade de 3500 lux. O meio de cultivo Provazzoli[®] com as vitaminas do complexo B foi renovado a cada 7 dias para preservação das cepas, e também foi verificado, por meio de microscopia óptica, a axênia do cultivo. Em caso de contaminação, as cepas eram

novamente isoladas em meio ágar-ágar estéril, misturado com meio de cultivo Provazzoli[®], para restaurar a pureza das cepas.

Tabela 3 - Composição do meio comercial Provazzoli[®] com vitaminas do complexo B.

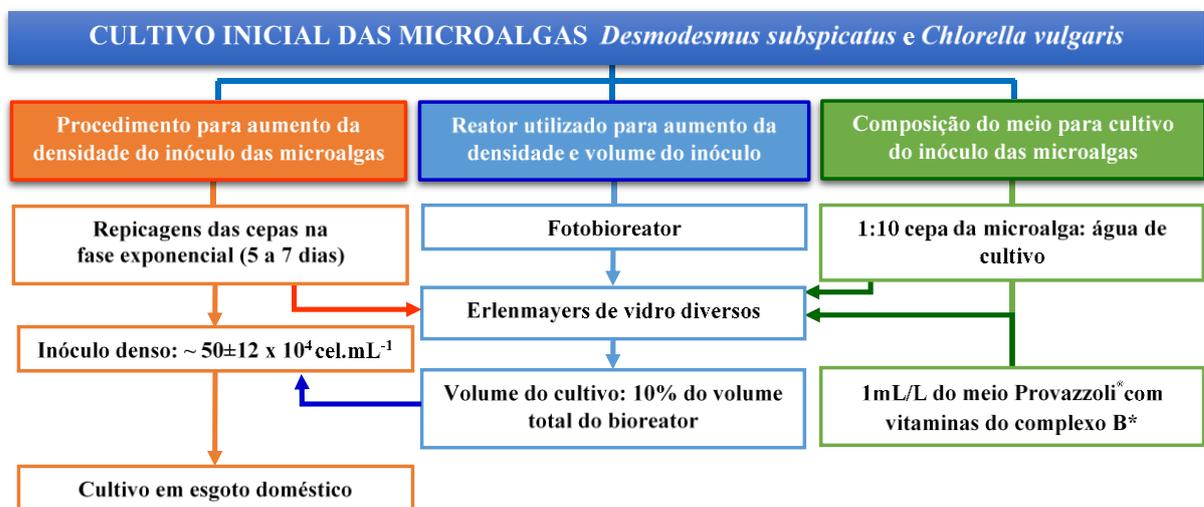
Composição	Concentração
Meio comercial Provazzoli [®]	
H ₃ BO ₃	1,93 g.L ⁻¹
FeCl ₃	0,053 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,273 g.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0367 g.L ⁻¹
COSO ₄ .7H ₂ O	0,008 g.L ⁻¹
Solução de EDTA 0,5 M	11,4 mL ⁻¹
Solução de vitaminas do complexo B	
Biotina (B7)	0,01 mL.L ⁻¹
Cianocobalamina (B12)	0,01 mL.L ⁻¹

Fonte: Provazzoli (1967).

4.2.4 Cultivo inicial das microalgas

O cultivo inicial das microalgas *Desmodesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris* buscou obter um inóculo denso, em volume suficiente para ser utilizado em todos os reatores. O inóculo foi obtido a partir de repicações gradativas das cepas das microalgas na fase de crescimento exponencial, para assegurar sua sobrevivência nas repicações seguintes. Em cada repicagem, aumentou-se o volume numa proporção 1:10 microalga: meio de cultivo (Figura 6) (LI *et al.*, 2010).

Figura 6 - Organograma das etapas do cultivo inicial das microalgas para aumento da densidade e volume do inóculo.



Fonte: A Autora (2019).

4.2.5 Preservação das cepas e cultivo das cianobactérias

As cepas da cianobactéria *Oscillatoria tenuis*, do grupo Cyanophyta de habitat dulciaquícola, foram provenientes do banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia, do Departamento de Engenharia Ambiental da Akdeniz Universitesi da cidade de Antalya, Turquia.

4.2.6 Água para preservação das cepas e cultivo inicial das cianobactérias

A água utilizada na preservação das cepas e nos cultivos iniciais da cianobactéria, foi água de abastecimento. Inicialmente, para eliminar a contaminação ambiental, o procedimento utilizado foi idêntico ao utilizado para a preparação da água utilizada na manutenção e cultivo inicial das microalgas (sub tópico 5.1.1). No entanto, as águas da região de Antália, Turquia, onde o experimento foi realizado, são muito duras (dureza maior que 180 mg CaCO₃) (WHO, 2011), o que dificultou a adaptação das cepas de cianobactérias. Portanto, um segundo procedimento foi adotado para remover a dureza e eliminar a contaminação ambiental da água, este consistiu em destilar e autoclavar a água.

4.2.7 Preservação das cepas das cianobactérias

As cepas foram preservadas em tubos *Falcon* de 15 mL contendo água tratada e autoclavada enriquecida com meio de cultivo comercial BG-11[®] e solução de micronutrientes A5 (Tabela 4), na proporção de 1mL deste para 1000 mL do cultivo das cepas (ALLEN, 1968). As culturas puras foram mantidas em uma incubadora com circulação interna de ar, temperatura de 21±1°C e iluminação constante com intensidade de 2500 lux. O meio de cultivo BG-11[®] com os micronutrientes foi renovado a cada 7 dias para preservação das cepas, e também foi verificado, por meio de microscopia óptica, a axênia das cepas; em caso de contaminação, as cepas foram isoladas em meio ágar-ágar estéril com meio de cultivo BG-11[®] com micronutrientes A5, para restaurar sua pureza.

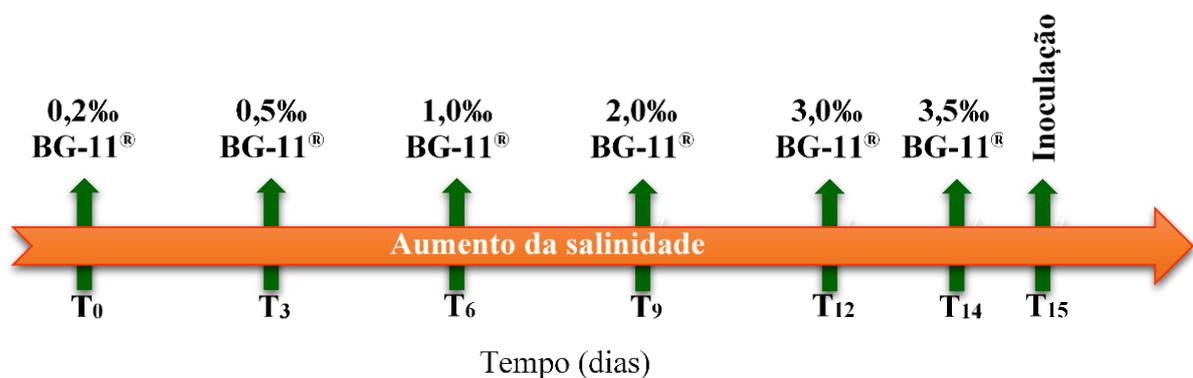
Tabela 4 - Composição do meio comercial BG-11® com micronutrientes A5.

Composição		Concentração
Solução	Meio comercial BG-11®	
A	K ₂ HPO ₄	40 g.L ⁻¹
B	MgSO ₄ .7H ₂ O	75 g.L ⁻¹
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	27 g.L ⁻¹
D	Na ₂ CO ₃	66 g.L ⁻¹
E	Ácido cítrico	6,0 g.L ⁻¹
	Citrato férrico amoniacal	6,0 g.L ⁻¹
	Na ₂ EDTA	1,0 g.L ⁻¹
Solução de micronutrientes A5		
	H ₃ BO ₃	5,72 g.L ⁻¹
	MnCl ₂ .4H ₂ O	3,62 g.L ⁻¹
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,44 g.L ⁻¹
	NaMo ₄ .2H ₂ O	0,72 g.L ⁻¹
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 g.L ⁻¹
	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,1 g.L ⁻¹

Fonte: A Autora (2019).

4.4.8 Adaptação das cianobactérias em ambiente salobro

As cepas da cianobactéria *Oscillatoria tenuis*, espécie utilizada para avaliar o potencial das cianobactérias em tratar efluentes da indústria têxtil e acumular lipídeos para produção de biodiesel, passaram por um processo de adaptação à ambiente salobro antes do cultivo inicial, uma vez que a salinidade destes efluentes é alta, aproximadamente 3‰. O processo de adaptação foi realizado por um período de 14 dias, nos quais, soluções salinas com diferentes concentrações, compostas por sais de bicarbonato de sódio, cloreto de sódio e sulfato de sódio na proporção 1,7:1,4:1, a mesma encontrada nos efluentes de indústrias têxteis, foram adicionadas gradativamente no meio de cultivo com as cepas (Figura 7).

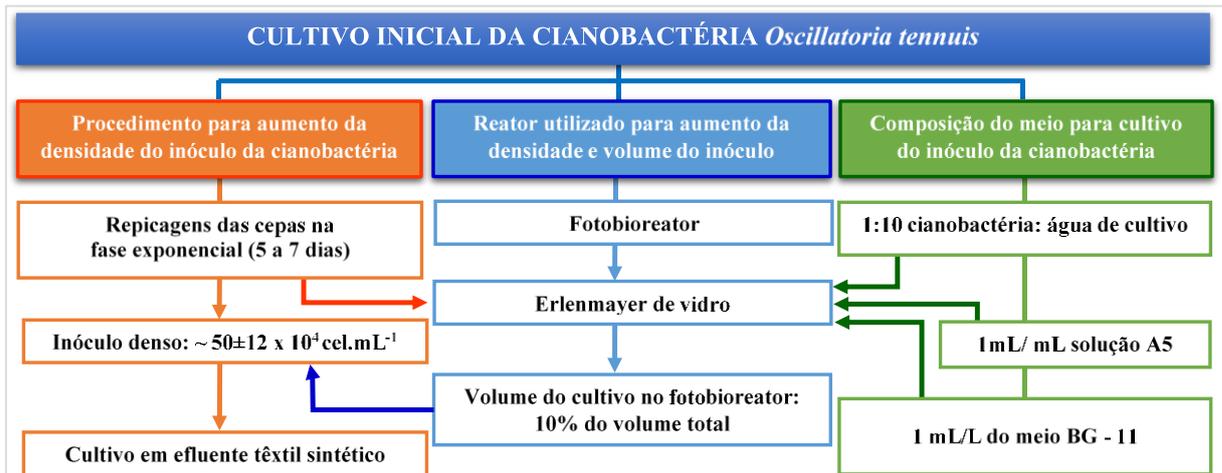
Figura 7 - Adaptação das cepas de cianobactéria à ambiente salobro.

Fonte: A Autora (2019).

4.2.9 Cultivo inicial das cianobactérias

O cultivo inicial da cianobactéria *Oscillatoria tennuis* buscou obter um inoculo denso (Figura 6), e com volume suficiente para ser aplicado em todos os fotobioreatores do experimento. O inoculo foi obtido de forma similar ao das microalgas, entretanto, as cianobactérias foram previamente adaptadas a um ambiente salobro antes do cultivo inicial.

Figura 8 - Organograma das etapas do cultivo inicial das cianobactérias para aumento da densidade e volume do inoculo.



Fonte: A Autora (2019).

*Na Tabela 4: Composição do meio BG-11[®] com micronutrientes

4.2.10 Montagem e operação do Experimento 1: Cultivo de microalgas em efluentes domésticos bruto e tratado

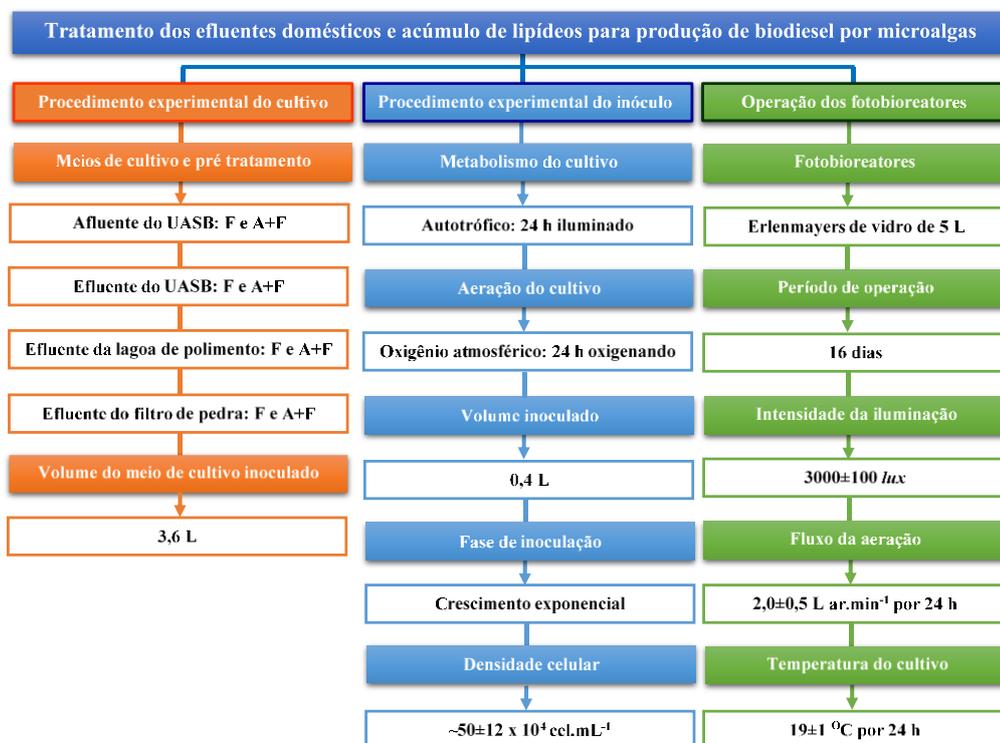
O experimento foi realizado em 9 fotobioreatores contendo como meio de cultivo o afluente e efluentes de cada unidade de tratamento da ETE - Rio Formoso. O afluente e efluentes coletados foram armazenados em recipientes opacos, para não sofrerem influência da luz, a uma temperatura de -4°C .

A influência das bactérias heterotróficas, naturalmente presentes no afluente e efluentes *in natura*, no crescimento das microalgas, foi avaliada por 2 processos, os quais consistiram em utilizar os meios de cultura filtrados (F) e filtrado e autoclavado (F+A). A filtração do afluente e efluentes foi realizada em filtros de celulose regenerada de $0,7 \mu\text{m}$ de poro. Na Figura 7 tem-se o procedimento seguido para avaliar o potencial das microalgas para tratar efluentes domésticos e acumular lipídeos para produção de biodiesel.

O afluente e efluentes utilizados foram caracterizados antes e durante a realização do experimento em termos das suas propriedades biológicas, demanda bioquímica de oxigênio

(DBO), densidade de bactérias heterotróficas e microalgal; e também físico-químicas, concentração de nutrientes dissolvidos, demanda química de oxigênio (DQO), condutividade elétrica, alcalinidade, salinidade, turbidez e acúmulo lipídico intracelular das microalgas. Durante a realização do experimento, o monitoramento dos parâmetros biológicos e físico-químicos foram realizados com análises diárias e um ciclo nictimeral, com intervalos de 4 horas no primeiro dia de monitoramento. As análises para a quantificação da produção de lipídeos intracelulares na biomassa microalgal foram realizadas no 5º, 10º e 15º dia de cultivo.

Figura 9 - Organograma do procedimento realizado para o cultivo de microalgas em efluentes domésticos.



Fonte: A Autora (2019).

*F=filtrado F+A=filtrado + autoclavado.

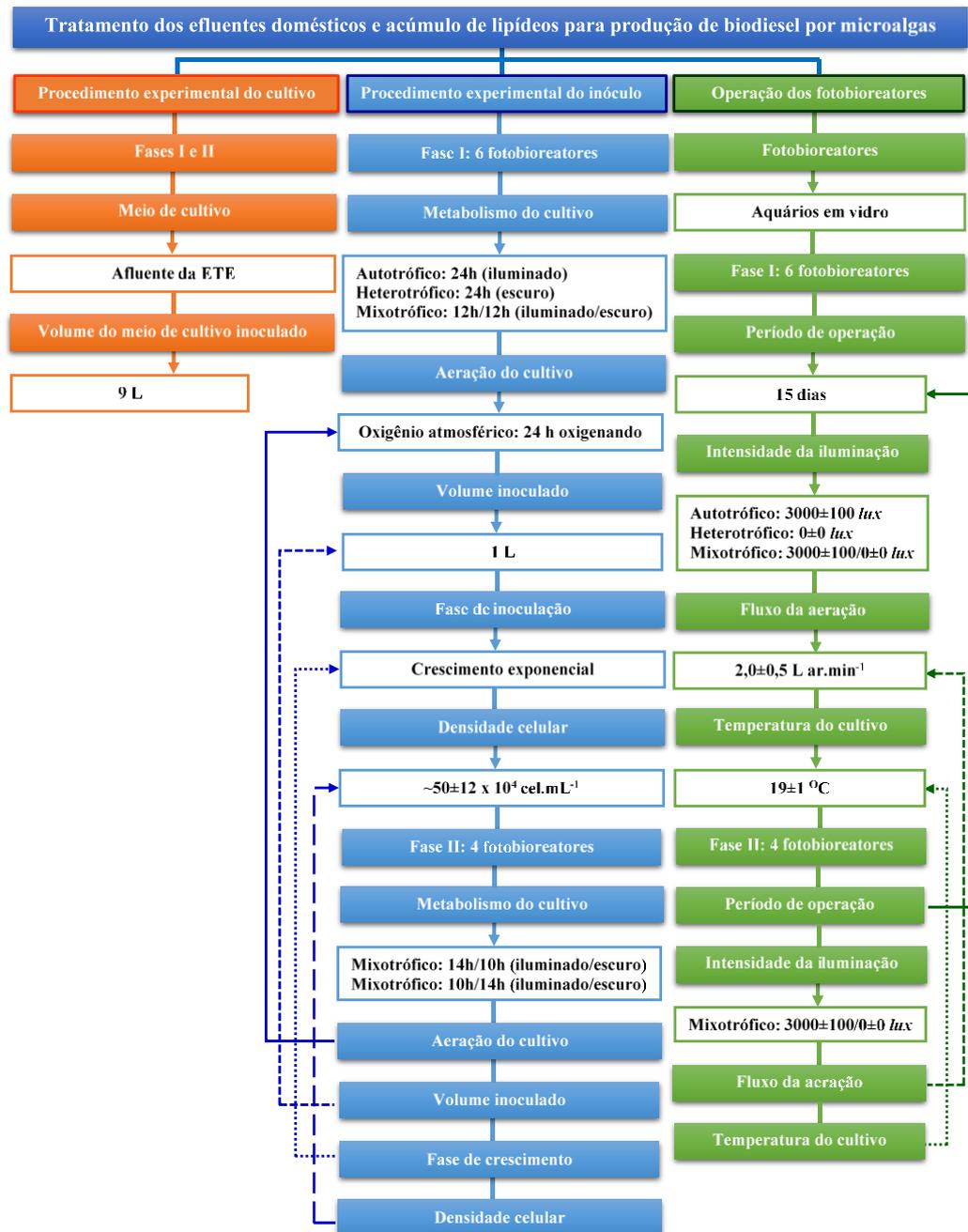
4.2.11 Montagem e operação do Experimento 2: Cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto

O experimento foi dividido em 2 fases, e buscou avaliar o efeito de 3 diferentes processos metabólicos de cultivo no crescimento microalgal, acúmulo lipídico intracelular e remoção de nutrientes de efluente doméstico bruto. Este foi o afluente *in natura* da ETE - Rio Formoso.

A Fase I foi realizada em 6 fotobioreatores e avaliou efeitos dos 3 processos metabólicos (autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico) no cultivo. Nestes, foram avaliados a produtividade (P), taxa de crescimento (r) e duplicação celular diária (k) das microalgas. Definida as melhores condições destes parâmetros para o crescimento da biomassa microalgal e acúmulo de lipídios intracelular, foi iniciada a Fase II. O procedimento experimental seguiu o organograma da Figura 10.

Na Fase II foi avaliado apenas o metabolismo fotoheterotrófico em duas condições de iluminação (foto período). Neste, os cultivos das microalgas foram submetidos a um ambiente iluminado seguido de um escuro por diferentes períodos de tempo. A Fase II foi realizada em 4 fotobioreatores iguais aos da Fase I, e com exceção do metabolismo, as demais condições de cultivo e operacionais também foram iguais aos da Fase I (Figura 10).

Figura 10 - Organograma do procedimento realizado para o cultivo de microalgas em efluente doméstico bruto.



Fonte: A Autora (2019).

4.2.12 Montagem e operação do Experimento 3: Cultivo de cianobactérias em efluente têxtil sintético

Efluente sintético com composição similar ao do efluente têxtil industrial foi utilizado no experimento. Neste, buscou-se avaliar o potencial da cianobactéria *Oscillatoria tenuis*, previamente adaptada à ambiente salobro, em tratar efluente da indústria têxtil, removendo cor e toxicidade; e acumular lipídeos intracelular para produção de biodiesel. O corante azo *Direct*

Black 22 (DB22), adquirido da Exatacor Araquímica Indústria e Comércio de Corantes, foi definido para compor o efluente têxtil sintético. Este foi selecionado por ser um dos corantes mais utilizados nas indústrias de tingimento de jeans da região do Agreste de Pernambuco, sua complexa estrutura química, na qual estão presentes 4 ligações azo, o que lhe confere alta recalcitrância, assim como os subprodutos formados na sua degradação, dos quais destaca-se as aminas aromáticas, e também por ser objeto de estudo de diversas pesquisas desenvolvidas pelo Grupo de Saneamento Ambiental da UFPE (AMARAL *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2013; dos SANTOS, 2005; MARCELINO, 2017).

a) Preparação do corante para compor o efluente têxtil sintético

O corante DB22 foi solubilizado em água deionizada, a qual teve o pH ajustado para 11 com solução de hidróxido de sódio a 20%, e aquecida por 1 hora à 80°C. Em seguida deixou-se a solução atingir a temperatura ambiente (~26°C), e ajustou-se o pH para 7 com ácido clorídrico (dos SANTOS, 2005).

b) Preparação das soluções de nutrientes para compor o efluente têxtil sintético

A composição da solução de micronutrientes, são apresentadas na Tabela 5 (PERENDECI *et al.*, 2013)

Tabela 5 - Composição da solução de micronutrientes.

Constituinte	Concentração
FeCl ₂	1275,6 mg.L ⁻¹
ZnCl ₂	50 mg.L ⁻¹
NiCl ₂ .6H ₂ O	142 mg.L ⁻¹
Mn.Cl ₂ .4H ₂ O	500 mg.L ⁻¹
Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O	164 mg.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	50 mg.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	38 mg.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	2000 mg.L ⁻¹
AlCl ₃ .6H ₂ O	90 mg.L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	50 mg.L ⁻¹
EDTA	1000 mg.L ⁻¹
HCl	1 mg.L ⁻¹

Fonte: A Autora (2019).

A composição da solução de macronutrientes, a qual foi adicionada bicarbonato de sódio (NaHCO_3), sulfato de sódio (Na_2SO_4), cloreto de sódio (NaCl) e solução de micronutrientes são descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição da solução de macronutrientes

Constituinte	Concentração
NH_4Cl	70 mg.L^{-1}
K_2HPO_4	63 mg.L^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25 mg.L^{-1}
CaCl_2	2 mg.L^{-1}
NaHCO_3	1200 mg.L^{-1}
Na_2SO_4	700 mg.L^{-1}
NaCl	1000 mg/L
Solução de micronutrientes	1 mg.L^{-1}

Adaptado de Florencio *et al.* (1993)

c) Preparação das fontes de carbono para compor o efluente têxtil sintético

Foram testadas 3 fontes de carbono, amido, etanol e glicose. No entanto, o amido está naturalmente presente nos efluentes têxteis, já que é utilizado no processo de engomagem das peças de jeans, e após o processo de desengomagem acaba compondo os efluentes das industriais têxteis. Para avaliar o grau de degradação do amido perante outros compostos de carbono mais simples, foram utilizados também etanol e glicose (BASTOS, 2012; MATA, 2010).

A solução de amido para ser adicionada ao efluente têxtil sintético foi preparada a partir de amido de milho comercial (*Misir Nisastasi*®) na concentração de 40 g.L^{-1} , o que corresponde a uma concentração de 34.200 $\text{mgO}_2\text{.L}^{-1}$ de DQO (solução estoque), a qual foi aquecida a 90°C por 30 minutos para solubilizar o amido (Figura 9), antes de ser adicionada aos biorreatores. Após adicionada no afluente de 1 litro apresentava DQO de ~1500 $\text{mg O}_2\text{/L}$.

A solução de glicose foi preparada para a concentração de 30 g.L^{-1} , o que corresponde a 32.527 $\text{mg O}_2\text{.L}^{-1}$ de DQO (solução estoque). Após adicionada no afluente de 1 litro apresentava DQO de ~1500 $\text{mg O}_2\text{/L}$. O etanol foi adicionado direto nos biorreatores para a concentração de 0,8 mL.L^{-1} (pureza 99,5%) para alcançar a mesma concentração de DQO apresentada para o amido e glicose.

Figura 11 - Solubilização do amido

Fonte: A Autora (2018).

d) Preparação do efluente têxtil sintético

A composição dos constituintes do efluente têxtil sintético nos fotobioreatores são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Composição do efluente têxtil sintético nos fotobioreatores.

Solução	Concentração
Corante DB22	0,032 μM
Macronutrientes (Tabela 6)	1 mL.L^{-1}
Amido, glicose ou etanol	1500 mg DQO.L^{-1}

Fonte: A Autora (2019).

e) Imobilização das cianobactérias

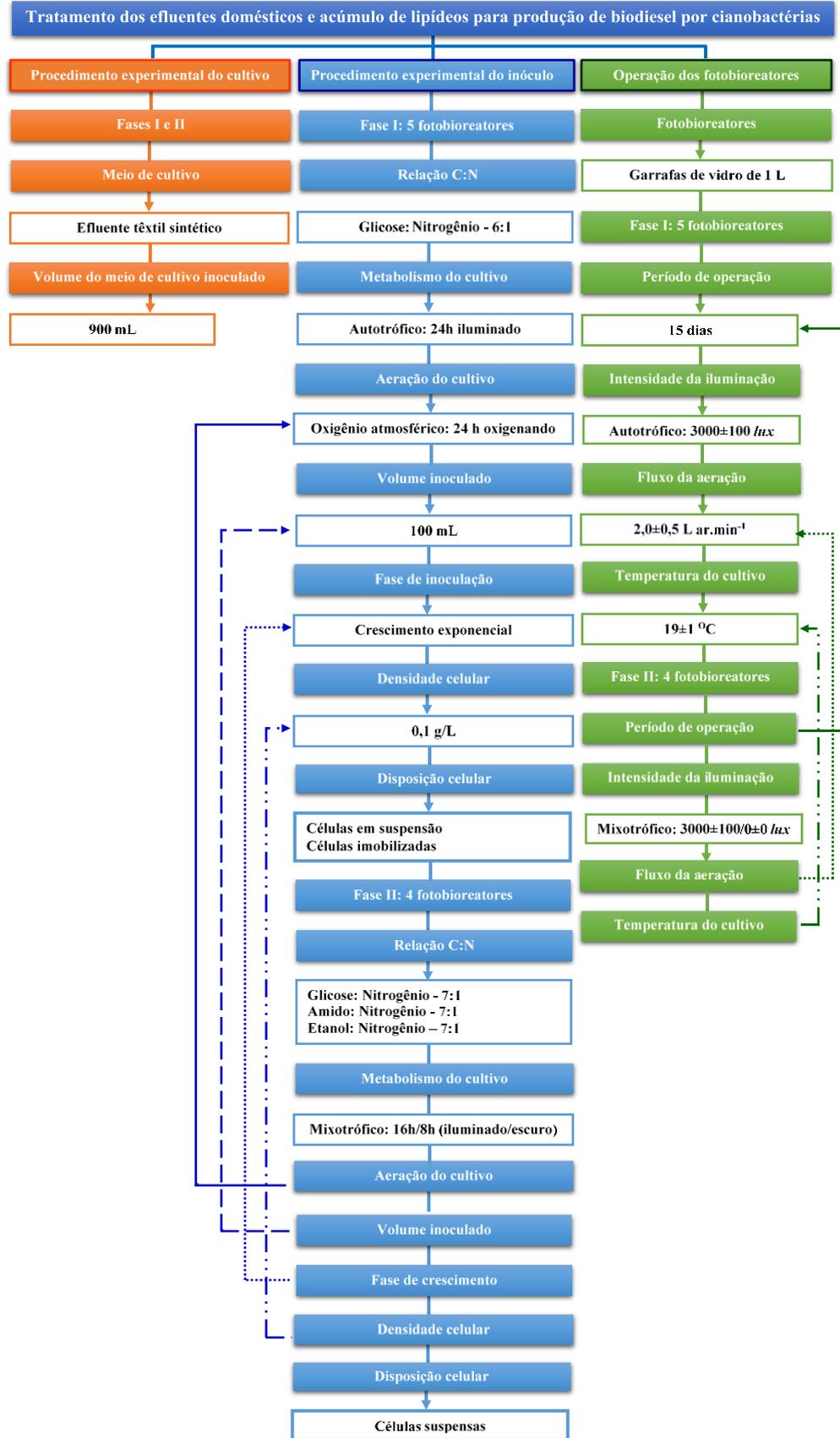
Com o objetivo de otimizar o tratamento de efluentes têxteis e aumentar o acúmulo lipídico pela cianobactéria, foi avaliada se a sua disposição celular no meio de cultivo influenciava de modo positivo ou negativo no objetivo proposto. Para isto, as células da cianobactéria foram dispostas no meio em suspensão e imobilizadas em alginato de sódio.

Para imobilizar as células da cianobactéria, foi preparada uma solução de alginato de sódio a 4%, a qual foi autoclavada e misturada ao inoculo das cianobactérias na proporção de 1:1. Os *beads* foram formados com auxílio de uma pipeta volumétrica de 25 mL, ajustada para gotear a solução dentro de um béquer contendo solução de cloreto de cálcio 0,4M sob agitação.

f) Cultivo de cianobactérias no efluente têxtil sintético

O experimento foi dividido em 2 fases, e buscou avaliar o efeito da intensidade luminosa, aeração, a fonte de carbono e a disposição celular no meio de cultivo, no crescimento da cianobactéria, acúmulo lipídico intracelular, remoção de nutrientes, cor e toxicidade de efluente têxtil. Na Fase I foi avaliada a influência da iluminação, aeração e a disposição celular, suspensa e imobilizada. A partir dos dados obtidos nesta fase, foi realizada a Fase II, que buscou otimizar o tratamento do efluente em termos de a remoção de compostos e toxicidade do meio e a produção de lipídeos intracelular. Na Figura 12 tem-se o organograma da realização do experimento.

Figura 12 - Organograma do procedimento realizado para o cultivo de cianobactérias em efluente têxtil sintético.



Fonte: A Autora (2019).

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os seguintes métodos analíticos foram aplicados neste trabalho:

4.3.1 Análises para determinação de parâmetros microbiológicos

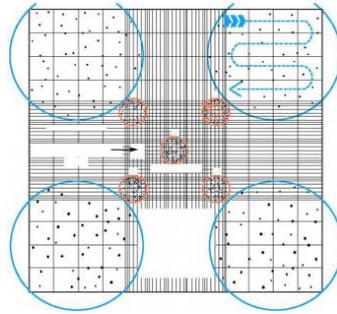
a) Determinação de clorofila α e bactérias heterotróficas

A análise de clorofila α foi realizada segundo o método padrão descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), nos 3 experimentos a cada 5 dias, para avaliar a atividade fotossintética das microalgas e cianobactérias; enquanto a determinação das bactérias heterotróficas totais foi determinada pelo método *Plate count* nos efluentes domésticos. As análises de clorofila α foram realizadas na biomassa das microalgas e cianobactérias dos experimentos 1, 2 e 3; enquanto, as de bactérias heterotróficas totais na biomassa bacteriana dos experimentos 1 e 2 (efluentes domésticos tratados e não tratados).

b) Contagem de microalgas

A densidade celular no cultivo foi determinada por microscopia ótica, pela contagem direta das células das microalgas em suspensão com uma câmara de Neubauer de dimensões 3 x 3 mm x 0,1 mm de profundidade (Figura 11). A contagem das células foi realizada, a priori, com base na concentração celular nos quadrantes da câmara. Nos casos em que as amostras estavam concentradas, foi realizado o somatório das células dos quadrados menores que se ligam as arestas do quadrado central e as do quadrado central da câmara, conforme área destacada em vermelho na Figura 13. Esta análise foi realizada na biomassa microalgal dos experimentos 1 e 2.

Figura 13 - Câmara de Neubauer com respectivos quadrantes para quantificação de altas (vermelho) e baixas densidades celulares (azul).



Fonte: Bicudo (2007).

A densidade celular (DC) foi determinada pelo número total de células por mililitro de amostra segundo a Equação 4.

$$DC = n^{\circ} \text{ total de céls} \times n^{\circ} \text{ de quadrantes contados} \times 10^4 \quad (5)$$

Nos casos que as amostras foram diluídas ou apresentaram baixas concentrações de células, a contagem foi realizada pelo somatório das células presentes nas arestas dos quadrados maiores e central, conforme área destacada em azul (Figura 11). Para os casos onde teve-se alta densidade, foi realizado o somatório das células nos quadrados menores, conforme destacado em vermelho (Figura 11). Especificamente para estes casos, o cálculo do número total de células por mililitro de amostra, foi calculado pela Equação 5.

$$DC = \frac{n^{\circ} \text{ total de céls}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times 10^4 \quad (6)$$

Onde DC corresponde a densidade celular (n° cel. mL^{-1}) e 10^4 corresponde a transformação de mm^3 para mL. A densidade celular máxima, (DCM_{ax}) foi calculada considerando o maior valor correspondente a contagem celular ao longo dos dias de experimento.

c) Densidade celular de microalgas e cianobactérias

A densidade celular no cultivo foi determinada a partir da retirada de uma alíquota de 50 mL do cultivo, a qual foi filtrada em filtro de celulose com poro de $0,7 \mu\text{m}$, previamente

pesado, após ser retirado da estufa, na qual passou 1h a 105°C para remover humidade. Após filtrar a amostra, o filtro, agora com as células, foi novamente para a estufa a 105°C por 1h para determinar o peso seco das células (LOURENÇO, 2006). Esta análise foi realizada na biomassa de microalgas e cianobactérias dos experimentos 1, 2 e 3.

d) Determinação da taxa de crescimento, produtividade, duplicação por dia, tempo de duplicação e taxa de consumo de nutrientes das microalgas e cianobactérias

Na Tabela 8 tem-se as equações usadas para a determinação da taxa de crescimento (r), produtividade (P), duplicação por *dia* (k), tempo de duplicação (T_2) e taxa de consumo de nutrientes (μNut) das células das microalgas segundo (LOURENÇO, 2006).

Tabela 8 - Equações matemáticas para determinação de parâmetros de crescimento de microalgas e cianobactérias

Parâmetro	Equação	
Taxa de crescimento	$r = \ln((N-N_0) \div (t-t_0))$	Eq. 6
	N é a densidade celular em um determinado tempo t (dias), N ₀ a densidade celular no tempo inicial (t ₀) e t (dias) o determinado tempo.	
Produtividade	$P = (X_t - X_0) \div (t-t_0)$	Eq. 7
	X _t (g.L ⁻¹) é a densidade celular em um determinado tempo t (dias) e X ₀ (g.L ⁻¹) a densidade celular no tempo inicial (t ₀).	
Duplicações por dia	$k = r \div \ln(2)$	Eq. 8
	k é determinado a partir da determinação de r pela Equação 6	
Tempo de duplicação	$T_2 = \ln(2) \div r$	Eq. 9
	T ₂ é determinado a partir da determinação de r pela Equação 6	
Taxa de consumo de N	$\mu\text{Nut} = \ln((S_0-S_f) \div (t_f-t_0))$	Eq.10
	S ₀ (mg.L ⁻¹) e t ₀ (dias) é a concentração de nutrientes e o tempo inicial, respectivamente; e S e t o final na biomassa.	

Fonte: A Autora (2019).

4.3.2 Análises para determinação de parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos, tais como demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), nitrogênio (N-NH₄⁺), fósforo (P-PO₄³⁻), sulfato (SO₃²⁻), pH, condutividade elétrica (CE), cor e turbidez foram monitorados nos meios de cultivo, efluente têxtil sintético, efluentes domésticos tratado e não tratado, segundo procedimentos descritos no *Standard Methods for Water and Wastewater* (APHA, 2012); para avaliar a remoção de carbono e nutrientes destes e o seu consumo pelas microalgas e cianobactérias. Na Tabela 9 tem-se uma síntese das análises realizadas nos efluentes e cultivos dos experimentos 1, 2 e 3.

Tabela 9 - Análises realizadas.

Meio	Análise	Método	Experimento
Efluente (m.c)	P-PO ₄ ³⁻	Molibdato-vanadato/kit Merk	1,2 e 3*
	N-NH ₄ ⁺	Colorimétrico	1,2 e 3*
	DQO*	Colorimétrico/kits Merk	3
	DBO	Incubação 5 ₂₀	1 e 2
	S-SO ₄	Colorimétrico	3
Cultivo	pH	Potenciométrico	1,2 e 3
	Salinidade	Potenciométrico	3
	CE	Potenciométrico	1,2 e 3

Fonte: A Autora (2019).

*Realizadas com kits da Merk®

As análises realizadas na caracterização dos efluentes domésticos não tratados e tratados utilizados nos experimentos 1 e 2, respectivamente; e no efluente têxtil sintético do experimento 3, são descritas na Tabela 10.

Tabela 10 - Caracterização dos efluentes utilizados.

Análise	Método	Efluentes
P-PO ₄ ³⁻	Molibdato-vanadato/kit Merk	Doméstico e têxtil
N-NH ₄ ⁺	Colorimétrico	Doméstico e têxtil
DQO	Colorimétrico/kits Merk	Têxtil
DBO	Incubação 5 ₂₀	Doméstico
pH	Potenciométrico	Doméstico e têxtil
Cor	Potenciométrico	Doméstico e têxtil
CE	Potenciométrico	Doméstico
Turbidez	Potenciométrico	Doméstico

Fonte: A Autora (2019).

4.3.3 Análises para quantificação e caracterização do óleo total das microalgas e cianobactérias

a) Extração e quantificação do teor de óleo total intracelular das microalgas e cianobactérias

A biomassa de microalgas e cianobactérias foram previamente liofilizadas, e uma massa de 0,5g foi utilizada para extração do óleo. Esta foi colocada em um aparato *Soxhlet* por 8h, o que equivale a aproximadamente 35 ciclos de lavagem contínua, com 150 mL de uma mistura metanol:clorofórmio 2:1. A quantificação do teor total de óleo foi realizada transferindo-se uma alíquota de 10 mL do extrato, obtido na extração com o *soxhlet*, para um frasco de vidro, previamente pesado e com tampa rosqueável. Este teve todo o solvente

evaporado em banho Maria a 60°C, e o conteúdo restante no frasco (óleo) foi determinado por gravimetria. A massa encontrada foi então relacionada com o volume total obtido na extração, o qual foi envasado para 50 mL, e continha a massa total de óleo dos 0,5g da massa liofilizada das microalgas e cianobactérias (HALLIN *et al.*, 2012; van WYCHEN E LAURENS, 2013). Este procedimento foi realizado para a biomassa de microalgas e cianobactérias dos experimentos 1, 2 e 3.

b) Caracterização da composição do óleo total em termos de lipídeos

A caracterização do óleo total extraído da biomassa foi realizada em termos da identificação e quantificação dos lipídeos mais favoráveis a produção de biodiesel como derivados de ácidos graxos de metil ésteres (FAME – *Fatty acids metil esters*) por cromatografia a gás. Os lipídeos foram previamente esterificados a seus derivados voláteis, os metil ésteres, para poderem ser analisados pela cromatografia a gás. O óleo para a identificação e quantificação dos lipídeos foi o mesmo utilizado para a determinação gravimétrica do teor total de óleo. Nos frascos de vidro que continha o óleo foi adicionado 2 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 10% em metanol e 2 mL de clorofórmio. Em seguida estes foram aquecidos em bloco digestor a 90 °C por 30 minutos para serem esterificados. Após os 30 minutos esperou-se que eles atingissem a temperatura ambiente, e aos frascos foi adicionado 1 mL de água ultrapura, os quais foram agitados em *vortex*, centrifugados a 2500 rpm por 3 minutos e colocados em repouso para a separação da fase orgânica não polar (clorofórmio + FAME) da fase polar (metanol + ácido sulfúrico + água). Por fim uma alíquota de 1 µL da fase orgânica foi analisada no cromatógrafo a gás (COMEAU *et al.*, 1988; HALLIN *et al.*, INDARTI *et al.*, 2014; van WYCHEN E LAURENS, 2013).

c) Análise cromatográfica dos FAME

Os FAME analisados são apresentados na Tabela 11. Os padrões analíticos utilizados para a identificação e quantificação destes FAME na biomassa de microalgas e cianobactérias foram adquiridos da Merck-Sigma Aldrich.

Tabela 11 - FAMES passíveis de serem identificados e quantificados pelo método cromatográfico

Nº	Nome IUPAC (oficial)	Nome usual	Fórmula
1	Hexanoato de metila	Caproato	C6:0
2	Octanoato de metila	Caprilato	C8:0
3	Decanoato de metila	Caprato	C10:0
4	Dodecanoato de metila	Laurato	C12:0
5	Tetradecanoato de metila	Miristato	C14:0
6	(Z)-tetradec-9-enoato de metila	Miristoleato	C14:1
7	Hexadecanoato de metila	Palmitato	C16:0
8	(Z)-hexadec-9-enoato de metila	Palmitoleato	C16:1
9	Octadecanoato de metila	Estereato	C18:1
10	(Z)-octadec-9-enoato de metila	Oleato	C18:1n9c
11	(Z)-octadec-11-enoato de metila	<i>cis</i> -vacenato	C18:1n7c
12	(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila	Linoleato	C18:2n6c
13	(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoato de metila	Linolenato	C18:3n6
14	Icosanoato de metila	Araquidato	C20:0
15	(Z)-icos-11-enoato de metila	<i>cis</i> -11-eicosenoato	C20:1n9
16	(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoato de metila	Araquidonato	C20:4n6
17	Docosanoato de metila	Behenato	C22:0
18	(Z)-docos-13-enoato de metila	Erucato	C22:1n9
19	Tetradecosanoato de metila	Lignocerato	C24:0
20	(Z)-tetracos-15-enoato de metila	Nervonato	C24:1n9
21	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoato de metila	Todos <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoato	C22:6n3

Fonte: A Autora (2019).

Para a identificação e quantificação dos FAME nas amostras foram utilizados um cromatógrafo a gás Agilent modelo 7890A com detector de ionização de chama (GC-FID), injetor *split/splitless* e sistema de injeção de amostras automático. Para a separação dos 21 FAME foi utilizada uma coluna cromatográfica Ommegawx de 30 m x 0,25 mm (D.I) x 0,25 µm de espessura de filme da Supelco. Na Tabela 12 tem-se as condições cromatográficas para a separação dos 21 FAME.

Tabela 12 - Condições cromatográficas para quantificação dos 21 FAME por GC/FID

Parâmetros		Valores
Volume de injeção da amostra		1 µL
Temperatura do injetor		250 °C
Modo de injeção		<i>Split 10:1</i>
Gás de arraste		Hidrogênio
Fluxo do gás de arraste		1 mL.min ⁻¹
Detector		FID
Temperatura do detector		300°C
Rampa de temperatura para a coluna analítica		
Taxa de aquecimento (°C.min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
-----	60	5
10	200	0
5	240	15

Fonte: A Autora (2019).

4.3.4 Análise estatística

Para Realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism® versão 8.0. Para avaliação da distribuição e homocedasticidade dos dados, foram aplicados, simultaneamente os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolgomorov-Smirnov. Dado o tipo de distribuição dos dados selecionados, elegeu-se o teste não paramétrico Kruskal Wallys para avaliar as diferenças estatísticas entre os tratamentos. O teste de Kruskal-Wallis é indicado na comparação entre pelo menos três amostras independentes, indicando diferenças entre pelo menos dois. Para análise de comparações múltiplas entre os dados, avaliando diferenças significativas entre os grupos numa matriz dois a dois, aplicou-se o teste de Dunn, quando H_0 foi rejeitada, ou seja, quando existiu diferenças entre os grupos, sendo possível indicar onde ocorreram essas diferenças (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos executados para este trabalho geraram resultados que serão descritos nos tópicos a seguir:

5.1 EXPERIMENTO 1: EFEITOS DA RELAÇÃO C/N E DENSIDADE BACTERIANA SOB O CRESCIMENTO DE *DESMODESMUS SUBSPICATUS* E *CHLORELLA VULGARIS* PARA TRATAMENTO DO EFLUENTE E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

Abaixo, segue a descrição detalhada de todos os resultados obtidos na execução do experimento 1:

5.1.1 Efluentes utilizados no experimento 1

Os efluentes utilizados neste trabalho foram escolhidos baseados em suas propriedades físico químicas favoráveis ao crescimento de organismos fotossintetizantes. A necessidade de um tratamento efetivo desses efluentes, de modo a viabilizar seu descarte seguro no meio ambiente, ao mesmo tempo em que são utilizados como meio de cultivo para microalgas, são aspectos considerados na escolha.

Os efluentes domésticos, embora considerados efluentes “diluídos” por conterem carga de DBO e nutrientes em concentrações reduzidas, ainda promovem grande impacto quando descartados sem tratamento efetivo. Além disso, tem composição favorável em termos de composição, concentração e proporção de nutrientes. Também são efluentes, que normalmente apresentam-se com reduzida cor e turbidez, o que promove melhor atenuação da luz para crescimento de organismos fotossintetizantes.

5.1.2 Características dos efluentes provenientes de diferentes etapas de tratamento

Os resultados das análises físico-químicas realizadas no efluente proveniente de diferentes etapas de tratamento estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Características dos efluentes de diferentes etapas de tratamento na ETE Rio Formoso.

Efluentes	DBO mg. O ₂ . L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg. L ^{-1*}	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ^{-1*}	CE μS.cm ⁻¹	pH	Turbidez NTU	UFC	C:N
Bruto (A)	192	31,98 ± 3	2,78 ± 0.2	982 ± 28	7.68	622	55x10 ⁶	6:1
UASB (E1)	169	35,00 ± 1	1,41 ± 0.1	657 ± 54	6.99	931	36x10 ⁵	5:1
Lagoa (E2)	185	22,52 ± 5	1,36 ± 0.4	1337 ± 36	7.98	636	5x10 ⁴	8:1
Filtros (E3)	60	18,06 ± 2	1,63 ± 0.3	1002 ± 98	7.03	127	14x10 ³	3:1

Fonte: A Autora (2019).

*Nutrientes dissolvidos

O afluente bruto não tratado e os efluentes provenientes das etapas subsequentes de tratamento, apresentaram características físico-químicas e biológicas comuns a um efluente municipal – baixa carga orgânica, nutricional, pH próximo a neutralidade e cor típica, tendo característica de esgoto diluído (METCALF; EDDY, 2012).

O esgoto tratado no reator UASB, apresentou em média uma carga 8,6 % maior de nitrogênio amoniacal dissolvido, em relação ao efluente bruto, recém chegado à ETE, devido ao processo natural de amonificação anaeróbia que ocorre nessas unidades. Também foi observado, uma maior turbidez no efluente desta etapa em relação as demais unidades de tratamento, o que pode ser relacionado à fatores como mistura e o contido do efluente e lodo no interior da unidade. A condutividade elétrica (EC) nas unidades E2 e E3, (pós lagoa e pós filtro) foram superiores, em relação às etapas de tratamento anteriores, o que foi associado à presença de matéria orgânica no efluente (E2) e a presença de minerais contidos nos filtros, como cascalho e areia (E3).

Os resultados das análises físico-químicas realizadas nos efluentes submetidos ao pré-tratamento por filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A), estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Características dos efluentes (pré tratados) de diferentes etapas de tratamento.

Efluente	DBO mg. O ₂ . L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg. L ^{-1*}	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ^{-1*}	EC μS.cm ⁻¹	pH	Turbidez NTU	UFC	C:N rateio
A (F)	180	30,03 ± 1	2,38 ± 0.2	783	7,70	512	44x10 ⁵	6:1
A (F+A)	176	29,00 ± 2	2,11 ± 0.8	780	7,97	518	ALD**	6:1
E1 (F)	154	30,10 ± 1	1,20 ± 0.1	598	6,98	886	15x10 ⁴	5:1
E1 (F+A)	155	26,33 ± 1	1,00 ± 0.3	573	7,45	886	ALD**	6:1
E2 (F)	183	18,50 ± 2	1,18 ± 0.4	1202	7,67	632	4x10 ³	10:1
E2 (F+A)	188	15,16 ± 4	1,28 ± 0.1	1278	8,01	644	ALD**	12:1
E3 (F)	35	16,06 ± 2	1,45 ± 0.3	443	7,00	112	8x10 ²	2:1
E3 (F+A)	35	16,00 ± 3	1,51 ± 0.1	398	7,33	108	ALD**	2:1

Fonte: A Autora (2019).

*Nutrientes dissolvido **Abaixo do limite de detecção

Foi observada uma discreta diminuição na concentração de nutrientes dissolvidos, o que também modificou a relação C:N nos efluentes de E1 e E2, após a filtração e a filtração seguida por esterilização em autoclave. A densidade bacteriana foi consideravelmente reduzida após apenas filtração dos efluentes. Atividade bacteriana não foi detectada após a filtração seguida de autoclave, comprovando a esterilidade dos efluentes. As eficiências de remoção de nutrientes e DBO estão dispostas na Tabela 15.

Tabela 15 - Eficiências de remoção nos diferentes meios de cultivo (%)

Espécie	Efluente	DBO mg.O ² . L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg.L ⁻¹ *	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ⁻¹ *	UFC
<i>D. subspicatus</i>	A	71	100	93	92
	AF	73	100	88	99
	A F+A	75	100	90	
	E1	63	100	93	92
	E1 F	56	100	93	90
	E1 F+A	73	100	91	
	E2	81	100	94	93
	E2 F	62	100	92	86
	E2 F+A	65	100	92	
	E3	100	100	96	99
	E3 F	100	100	98	80
	E3 F+A	100	100	99	
<i>C. vulgaris</i>	A	74	100	100	99
	AF	73	100	100	99
	A F+A	78	100	100	
	E1	66	100	100	98
	E1 F	70	100	100	98
	E1 F+A	76	100	100	
	E2	86	100	100	96
	E2 F	75	100	100	93
	E2 F+A	74	100	100	
	E3	100	100	100	89
	E3 F	100	100	100	80
	E3 F+A	100	100	100	

Fonte: A Autora (2019).

A partir de uma análise geral dos resultados, é possível observar a completa remoção de N-NH₄⁺ e elevadas eficiências de P-PO₄³⁻ pelas espécies em todos os cultivos. As eficiências na remoção de DBO, estiveram entre 62 e 100% nos cultivos contendo *D. subspicatus* e 66 a 100% nos cultivos contendo *C. vulgaris*. O comportamento desses parâmetros serão discutidos nos tópicos adiante. Na Tabela 16 abaixo, tem-se os aspectos de produtividade da biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris* utilizadas neste experimento.

Tabela 16 - Produtividade de *Desmodesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris* nos diferentes efluentes

Espécie	Efluente	DCM _{ax} cel.10 ⁴	Biomassa total g.L ⁻¹	Óleo total mg.g ⁻¹	FAMES total mg.g ⁻¹
<i>D.subspicatus</i>	A	4055	2,1	400	70,2
	AF	2505	2,0	380	62,2
	A F+A	3500	1,6	380	50,0
	E1	2500	1,1	260	28,7
	E1 F	1965	0,9	250	12,3
	E1F+A	1920	0,9	230	13,8
	E2	2800	1,78	270	21,4
	E2 F	1885	1,52	300	38,5
	E2 F+A	3000	1,0	290	90,0
	E3	2004	0,8	530	22,0
	E3 F	1456	0,8	460	19,8
	E3 F+A	1502	0,7	460	103
<i>C.vulgaris</i>	A	2110	2,3	380	22,8
	AF	2000	2,0	110	25,9
	A F+A	2045	1,4	80	26,0
	E1	3998	2,5	170	27,3
	E1 F	2250	2,1	250	41,0
	E1 F+A	2000	1,9	180	16,3
	E2	1755	1,1	270	37,3
	E2 F	2175	1,0	280	57,0
	E2 F+A	996	0,8	290	23,6
	E3	702	1,0	490	33,0
	E3 F	699	0,9	500	31,0
	E3 F+A	699	0,8	460	23,0

Fonte: A Autora (2019).

A partir de uma análise geral dos resultados, nota-se que para *D. subspicatus*, a DCM_{ax} e consequentemente o quantitativo de biomassa total, foi observado no cultivo realizado em afluente bruto, A, e uma maior produção de óleo total e FAMES, se deu no efluente final E3 e seus tratamentos E3F e E3F+A.

Em se tratamento de *C. vulgaris*, a DCM_{ax} e consequentemente o quantitativo de biomassa total, foi observado no efluente do UASB, E1 e uma maior concentração de óleo total e também se deu no efluente final E3 e seus tratamentos E3F e E3F+A. As concentrações de FAMES, obtiveram valores muito próximos em todos os tratamentos. Esses parâmetros serão discutidos nos tópicos adiante.

5.1.3 Escolha das espécies de microalgas

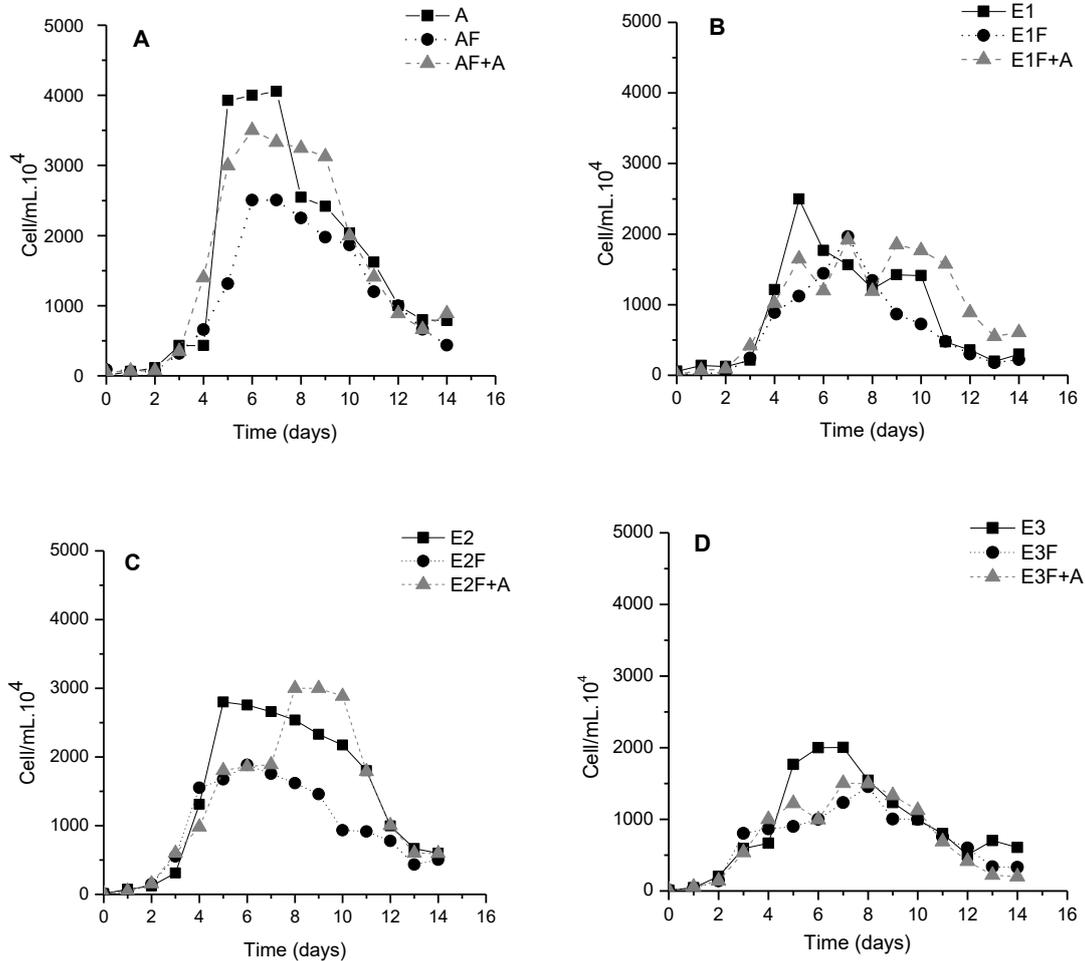
As espécies de microalgas avaliadas neste estudo foram escolhidas por serem tipicamente encontradas nos esgotos tratados em sistemas de tratamento, principalmente aqueles naturais, baseado em lagoas de estabilização e lagoas de polimento da região, conforme já foi avaliado nos trabalhos de Barbosa (2013); Paiva (2012); Pastich-Gonçalves (2011), em ETE's do litoral sul e do sertão pernambucano. Dessa forma, a obtenção das espécies locais,

teve como propósito avaliar o potencial de espécies abundantemente encontradas nos sistemas de tratamento de efluentes da região.

5.1.4 Crescimento das microalgas

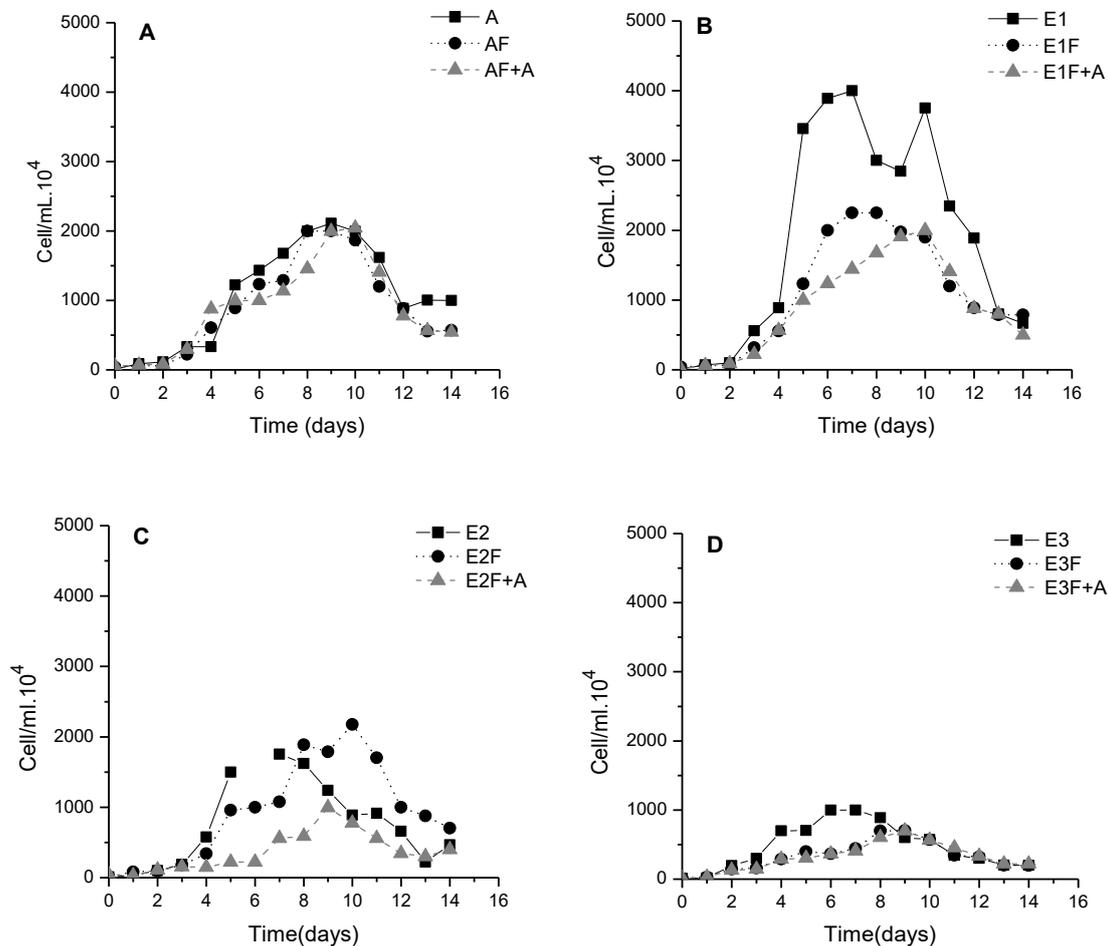
Nas Figuras 14 e 15 abaixo, tem-se as curvas de crescimento de *D. Subspicatus* e *C. vulgaris* nos diferentes efluentes utilizados.

Figura 14 - Curvas de crescimento de *D. subspicatus* em afluente bruto (A), efluente de UASB (B), efluente de lagoa de polimento (C) e filtros de pedra (D), submetidos à filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A)



Fonte: A Autora (2019).

Figura 15 - Curvas de crescimento de *C. vulgaris* em afluente bruto (A), efluente de UASB (B), efluente de lagoa de polimento (C) e filtros de pedra (D), submetidos à filtração (F) e filtração seguida de autoclave (F+A).



Fonte: A Autora (2019).

A partir de uma análise do padrão das curvas de crescimento, foi possível observar um desenvolvimento mais eficiente de *D. subspicatus* no afluente bruto (A) e seus tratamento (AF) e (AF+A). Para *C. vulgaris*, as células apresentaram crescimento mais acentuado no efluente de reator UASB sem pré-tratamento (E1).

A fase *lag* de crescimento, pôde ser observada por pelo menos 3 dias em todos os cultivos. Este crescimento mais lento pode ser atribuído ao período de adaptação das células aos novos meios/efluentes testados, visto que as cepas foram mantidas em meio comercial até o início do experimento. Segundo Becker (1994), a fase *lag* para culturas adaptadas, pode durar cerca de 24h, já culturas não adaptadas, podem permanecer por dias na fase *lag*, apresentando pequenas evoluções diárias, devido a taxas de crescimento específico mais baixas e maior tempo de duplicação celular.

Para ambas as espécies, a fase exponencial de crescimento foi observada entre o 3º e 4º dia em todos os tratamentos. A fase de declínio, foi observada a partir do 8º dia, dada a deficiência nutricional do meio e possivelmente o excesso de metabólitos tóxicos presentes, o que resultou na acumulação de células inativas em suspensão, ou depositadas no fundo dos reatores.

A DCM_{max} , nos cultivos de *D. subspicatus* foi registrada no afluente bruto (A) no 5º dia de cultivo. Para *C. vulgaris* a DCM_{max} foi registrada DCM_{max} no 7º dia para cultura crescida no efluente de reator UASB sem tratamento (E1).

5.1.5 Relação C:N, densidade bacteriana e crescimento

Alguns autores discutem sobre a importância das concentrações de amônia no meio em que crescem microalgas, sendo esta essencial para sua sobrevivência. Dentre todos os macronutrientes necessários ao metabolismo das microalgas, o nitrogênio em todas as suas formas de oxidação é o mais requerido para seu crescimento por ser constituinte na formação de diversas substâncias do metabolismo primário. A abundância desse nutriente no meio tende a aumentar a quantidade de proteínas e clorofilas nas células, e sua deficiência, tende a diminuir as taxas de crescimento (BERTOLDI 2008; LOURENÇO 2006).

No entanto, em se tratando de crescimento em águas residuais, é importante ressaltar a influência que a relação C:N exerce sobre o crescimento algal (resultados expressos nas Tabelas 13 e 14). Neste trabalho, para mensurar esta relação, foram considerados a DBO dissolvida e o nitrogênio amoniacal dissolvido.

Segundo Hecky *et al.*, (1998), em estudo sobre o enriquecimento de ambientes aquáticos dulcícolas e marinho, concluiu-se que a relação C:N 7:1, é considerada ótima para o desempenho máximo de células fotossintetizantes e relações menores ou maiores a esta, pode significar carência nutricional para o crescimento, devido a proporção de captura de cada nutriente pela célula. Benemann (2003), considerou que uma menor relação C:N, em torno de 6:1, é mais favorável ao desenvolvimento de organismos fotossintetizantes, tanto de hábito marinho como dulciaquícola. Dessa forma, nos resultados obtidos neste estudo, as relações C:N iniciais mais próximas ao favorável para o desenvolvimento microalgal, foi observado nos meios E1 e A, assim como nos seus tratamentos (F e F+A).

Embora a relação C:N tenha sido similar, o meio A (C:N = 6:1) e seus tratamentos F (C:N = 6:1) e F+A (C:N = 6:1), favoreceu o desenvolvimento de *D. subspicatus*, e o meio pós UASB E1 (C:N= 5:1) e seus tratamento F (C:N = 6:1) e F+A (C:N= 5:1), melhor favoreceu o desenvolvimento de *C. vulgaris*.

Vale salientar que os meios de E1, apresentaram maior turbidez em relação a A E2 e E3 (Tabelas 12 e 13). Diante dos resultados obtidos, ao se avaliar o crescimento de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, nos meios A e E1, pode-se dizer que a turbidez, pode tornar-se um fator limitante para o desenvolvimento das espécies, sendo a espécie *D. subspicatus* favorecida em ambientes menos turvos, e a espécie *C. vulgaris* favorecida em ambientes mais turvos.

Outro aspecto relevante, deve ser destacado para o crescimento das espécies nos meios de E2, que apresentou relação C:N acima das proporções ótimas para o desenvolvimento de micro-organismos fotossintetizantes. Essa condição, pode ter sido limitante para o desenvolvimento máximo de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*. O crescimento das espécies nos efluentes E3, foi limitado, sobretudo, pela carência nutricional, estando muito inferior à relação mínima favorável ao desenvolvimento ótimo de microalgas.

O melhor desenvolvimento de *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nos meios A e E1, pode estar relacionado à presença massiva de bactérias nos meios, e ao contínuo suprimento de C inorgânico fornecido por estas. Os meios A e E1, obtiveram as mais altas densidades de bactérias, em contrapartida, maiores concentrações de matéria orgânica (DBO) também foram observadas (normalmente observadas nessas etapas de tratamento - afluente e pós UASB). Dessa forma, um melhor desenvolvimento pode estar relacionado ao consumo aeróbio da matéria orgânica, favorecendo o crescimento das microalgas nesses meios. A influência da densidade bacteriana na degradação da M.O, será discutido nas sessões posteriores.

É importante destacar, que não foram considerados o C inorgânico produzido pela ação bacteriana durante o experimento, ou seja, não foram mensurados de modo isolado, sendo assim, a relação C:N consideradas nos efluentes que não receberam pré tratamento (A, E1, E2 e E3), podem ser maiores do que o destacado, devido a introdução bacteriana de CO₂ via degradação de matéria orgânica presente no esgoto. Estudos posteriores devem ser realizados considerando essa via de introdução de C, visando uma melhor elucidação deste aspecto.

Estatisticamente, houve diferenças significativas no crescimento de *D. subspicatus* cultivado nos efluentes de A ($p=0,031$) não havendo para E1 ($p=0,18$) e E2 ($p=0,18$) e E3

($p=0,6$). Na análise de comparações múltiplas, foram detectadas diferenças ($p=0,002$), principalmente entre os meios de A e E3 e A e E1 (relatório em anexo). Para *C. vulgaris*, foram observadas diferenças entre os cultivos em E1 ($p=0,0020$), não havendo para os cultivos de A ($p=0,72$), E2 ($p=0,07$) e E3 ($p=0,72$). Foram observadas diferenças significativas quando comparados todos os efluentes sob todas condições ($p=0,005$), observando principalmente diferenças nos cultivos entre A e E1 e A e E3 (relatório em anexo).

5.1.6 TAXA DE CRESCIMENTO, PRODUTIVIDADE E TEMPO DE DUPLICAÇÃO

Na Tabela 17, estão dispostas as Taxas máximas de crescimento (r) produtividade celular média (P), taxa de remoção de N e P (μN e μP), duplicações por dia (k) e tempo de duplicação (T_2) para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nos meios de cultivo utilizados.

Tabela 17 - Taxas máximas de crescimento (r) dia^{-1} , produtividade celular média (P) $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, taxa de remoção de N e P (μN e μP) dia^{-1} , duplicações por dia (k) dia^{-1} e tempo de duplicação (T_2) dia^{-1} para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nos meios de cultivo utilizados.

<i>D. subspicatus</i>							<i>C. vulgaris</i>						
Meio	R	P	μN	μP	k	T_2	Meio	r	P	μN	μP	k	T_2
A	2,02	0,103	0,87	0,56	2,91	0,34	A	1,75	0,066	0,86	0,58	2,58	0,39
AF	1,17	0,056	1,25	0,47	1,69	0,59	AF	1,25	0,057	0,99	0,96	1,81	0,55
A F+A	1,46	0,056	1,09	0,82	2,11	0,47	A F+A	1,19	0,051	0,75	0,93	1,72	0,57
E1	1,23	0,030	0,98	1,43	1,77	0,56	E1	1,46	0,079	1,03	0,91	2,15	0,46
E1F	1,51	0,020	0,85	0,75	2,18	0,45	E1F	1,43	0,069	0,46	0,95	2,06	0,48
E1 F+A	1,20	0,019	1,24	0,54	1,73	0,55	E1F+A	0,90	0,062	0,64	0,82	1,33	0,74
E2	1,18	0,061	0,74	1,49	1,71	0,58	E2	0,70	0,043	1,19	0,96	1,01	0,98
E2F	1,26	0,036	0,67	0,44	1,83	0,54	E2F	0,91	0,039	0,76	0,97	1,31	0,75
E2F+A	0,67	0,031	0,83	1,44	0,97	1,02	E2F+A	0,10	0,058	0,90	0,96	0,14	0,93
E3	0,85	0,020	0,76	1,58	1,01	0,80	E3	1,13	0,020	0,70	0,82	1,63	0,61
E3F	0,98	0,037	1,00	1,58	1,22	0,70	E3F	1,33	0,018	0,81	1,38	1,02	0,51
E3F+A	0,76	0,020	0,64	1,60	1,10	1,00	E3F+A	1,51	0,017	0,94	1,49	1,14	0,60

Fonte: A Autora (2019).

Nota-se que os maiores valores de r e P foram encontrados onde se obteve uma relação C:N mais próxima ao ótimo para o crescimento das microalgas (sendo para *D. subspicatus* o efluente A e E1F, onde as relações foram 6:1 e 5:1 respectivamente e para *C. vulgaris* A e E1, onde a relação em ambos foi de 6:1) – Tabelas 12 e 13. Esses resultados corroboram com o discutido por Benemann (2003), quando relata que as células microalgas dependem de uma proporção C:N ótima para que seu crescimento seja conduzido a desempenho máximo. Nota-se que o esgoto doméstico bruto e aquele oriundo de um tratamento em reator UASB, favorecem elevadas taxas de crescimento e produtividade P (sendo melhor observada em A (para *D. subspicatus*) e E1 (para *C. vulgaris*)).

Em se tratando de taxas de crescimento, (r) Morais e Costa (2007), encontraram uma resposta similar usando cepas de *Scenedesmus obliquos* cultivadas num conjunto de três fotobiorreatores. No entanto, a taxa máxima de crescimento obtida, para *Scenedesmus obliquos* ($r = 1,50 \text{ dia}^{-1}$), foi menor do que os valores encontrados para *D. subspicatus* ($r = 2,02 \text{ dia}^{-1}$) e *C. vulgaris* ($r = 1,75$) em esgoto não-tratado (A). Taxas de crescimento e produtividade elevadas, podem estar relacionada à maior disponibilidade de nutrientes e em proporção ótima ao crescimento microalgal.

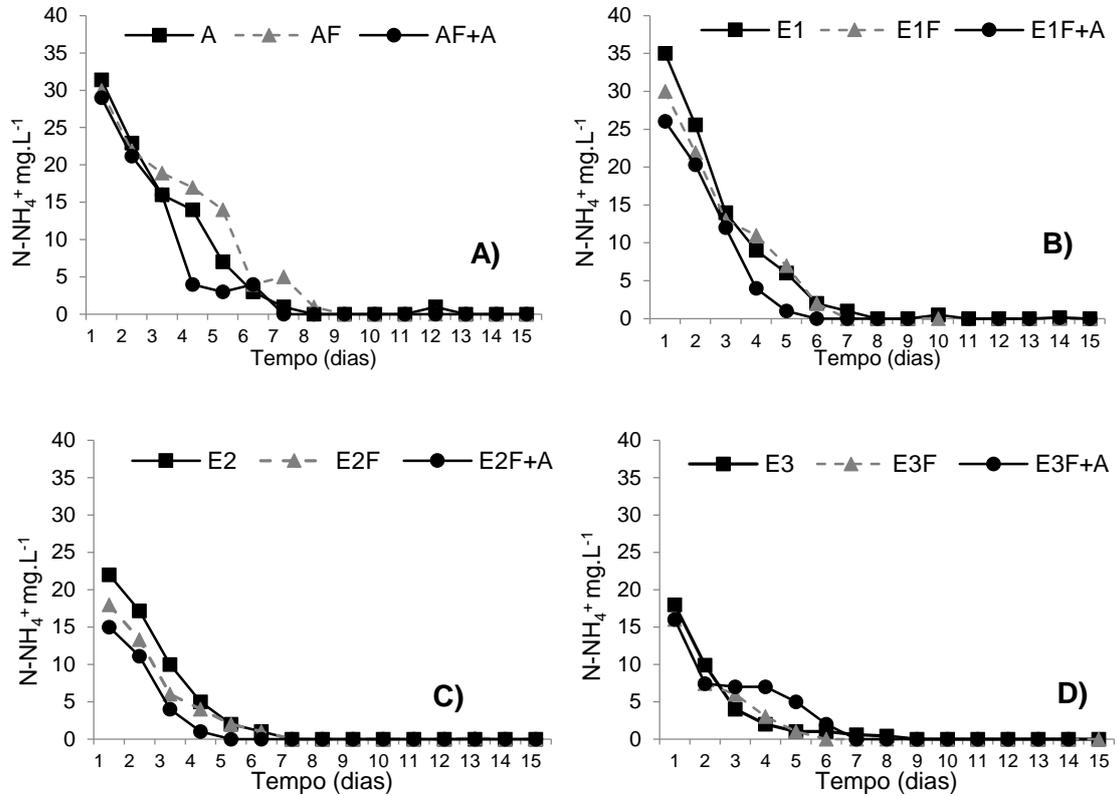
Esses efluentes são também os que apresentam alta densidade bacteriana, podendo este fato, também explicar o favorável crescimento celular. O suprimento de carbono inorgânico, oriundo da respiração celular em face ao consumo da matéria orgânica dissolvida e particulada presente no meio, pode também ter sido um mecanismo de reposição de carbono no meio, mantendo-se um equilíbrio da relação C:N à medida que o carbono orgânico dissolvido era consumido.

Também é válido ressaltar, que o carbono inorgânico da respiração bacteriana, pode ter sido a fonte preferível de carbono pelas microalgas durante crescimento celular, já que esta é uma fonte mais facilmente assimilável, podendo este fato explicar o maior sucesso nos aspectos de crescimento naqueles cultivos utilizando-se de esgoto sem tratamento - com maiores densidades bacterianas. Neste caso, pode-se assumir que a esterilidade do efluente é um fator relevante no aumento dos aspectos de crescimento.

5.1.7 Remoção de nutrientes

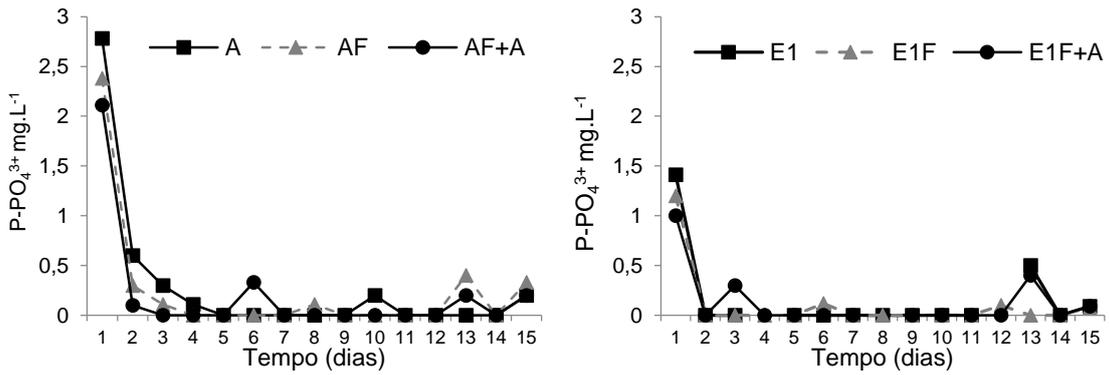
A Remoção de N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} por meio de *D.subspicatus* cultivadas em E1, E2 e E3 e seus respectivos tratamentos, estão dispostas nas Figuras 16, 17, 18 e 19 a seguir:

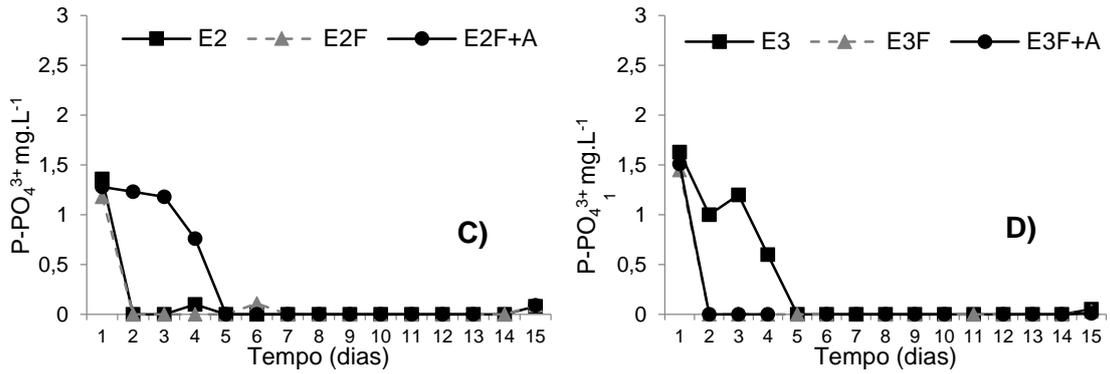
Figura 16 - Remoção de $N-NH_4^+$ por meio de *D.subspicatus* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos



Fonte: A Autora.

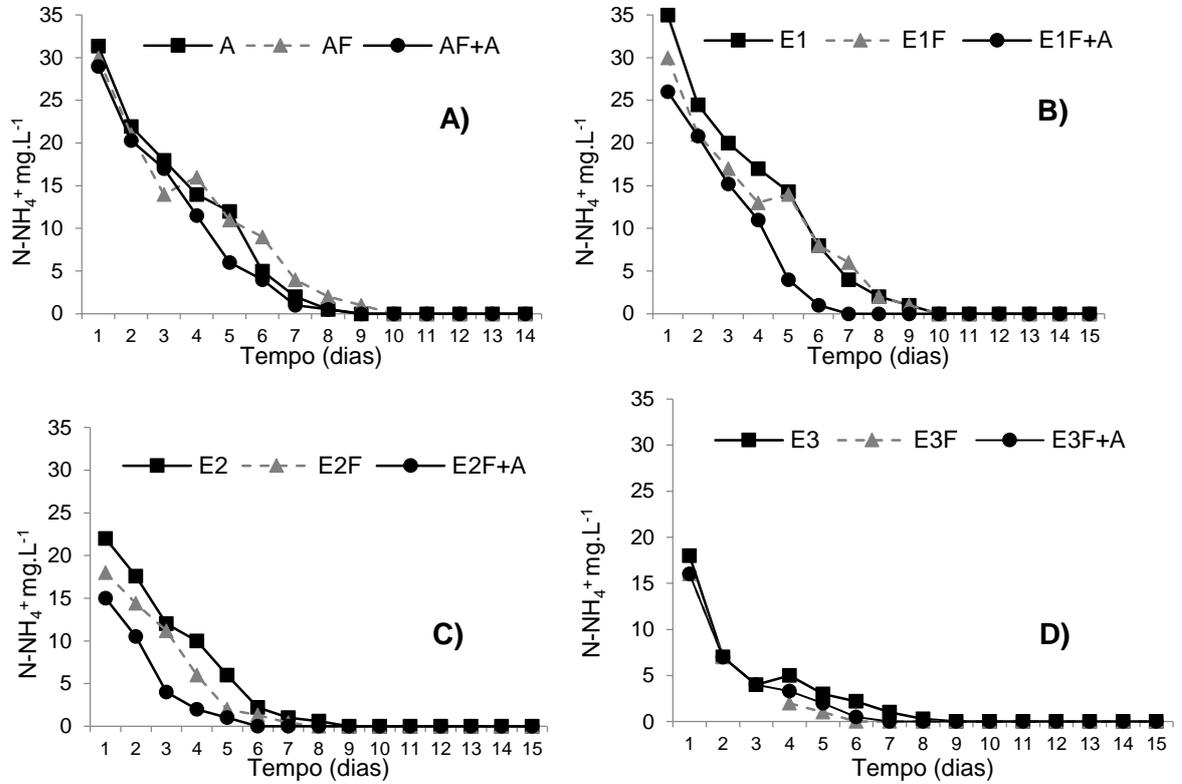
Figura 17 - Remoção de $P-PO_4^{3-}$ por meio de *D.subspicatus* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.





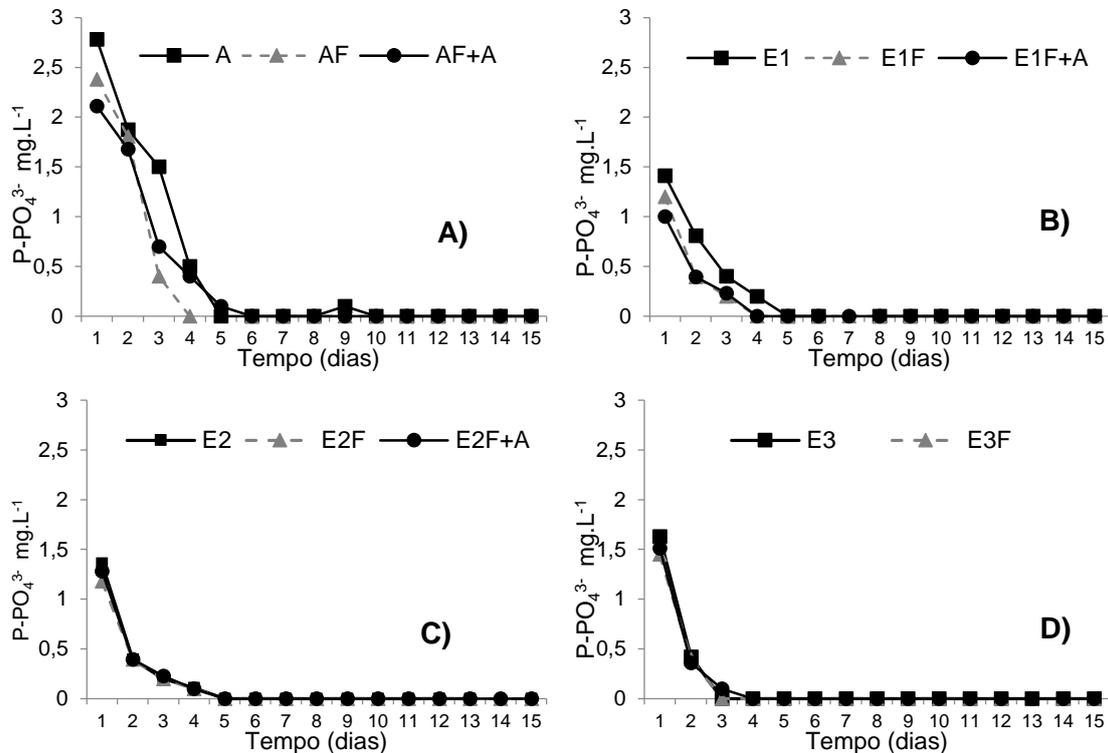
Fonte: A Autora.

Figura 18 - Remoção de N-NH_4^+ por meio de *C.vulgaris* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 19 - Remoção de $P-PO_4^{3-}$ por meio de *C.vulgaris* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos.



Fonte: A Autora (2019).

É válido destacar que em todos os efluentes avaliados, a espécie *D.subspicatus*, promoveu o total consumo de nutrientes do meio ligeiramente mais rápido, em relação a *C.vulgaris*, como pode ser visto pelo comportamento das curvas na Figura 13, 14, 15 e 16 acima.

Possivelmente esse comportamento se dá pelo fato da espécie *D. subspicatus* ter estado em concentrações ligeiramente mais abundante no meio, conforme se nota nas curvas de crescimento (Figuras 12 e 13) e possivelmente por exibir características de adaptação ao meio.

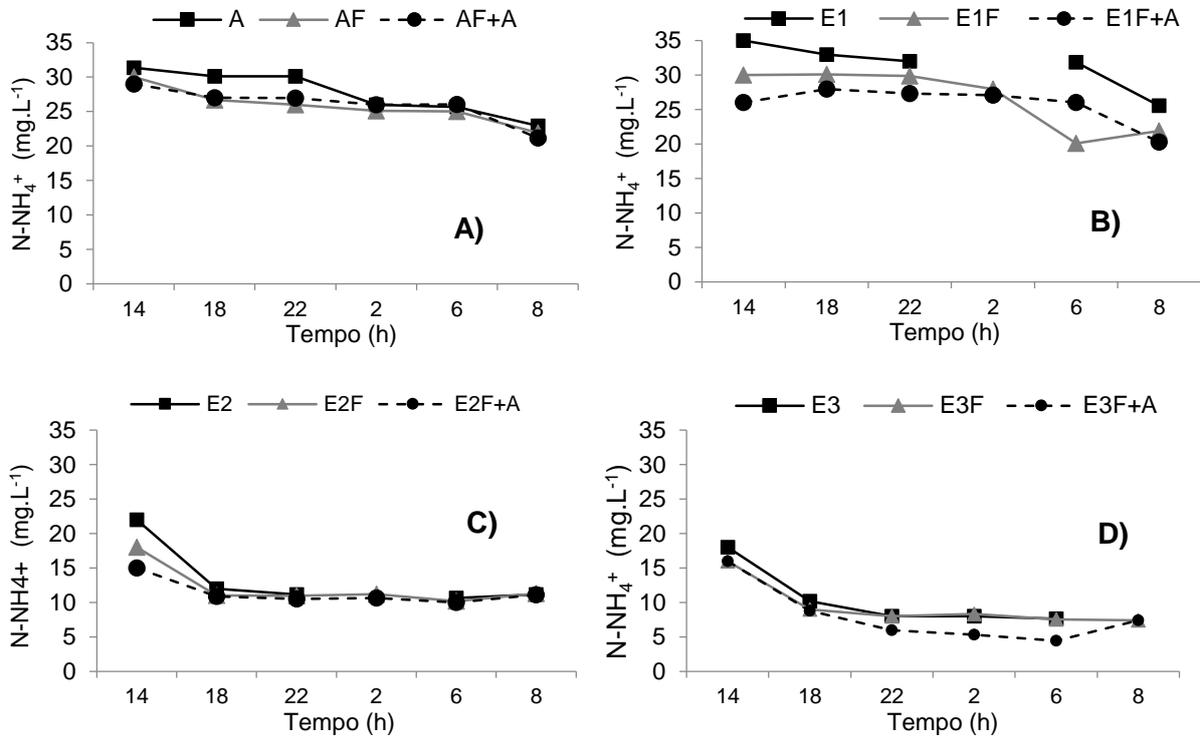
No geral, as células tanto de *D. subspicatus* como de *C. vulgaris*, cultivadas especialmente nos efluentes de A e E1, apresentaram-se menores do que normalmente observado quando cultivadas em meio de cultura comercial (dados não mostrados). Além disso, a espécie *D. subspicatus*, apresentou um menor número de células nas colônias, variando entre apenas 2 a 4 células, especialmente nos reatores contendo maior concentração de nutrientes e DBO, em comparação ao cultivo controle, conduzido em meio Provazzoli, que variaram entre 8 a 10 células por colônia.

Segundo Salomoni (1997), o tamanho celular reduzido é uma resposta adaptativa de organismos que se desenvolvem em ambientes ricos em nutrientes ou metais e materiais orgânicos dissolvidos. Células de menor diâmetro possuem uma maior eficiência na absorção e assimilação de nutrientes (caracterizadas como r- estrategistas) devido à maior razão superfície/volume. Essa característica adaptativa, também provê a esses organismos, maiores taxas de crescimento e conseqüentemente maior produtividade. Dentre as duas espécies avaliadas neste estudo, biologicamente a espécie *C. vulgaris* apresenta um menor diâmetro celular em comparação com a *D. subspicatus*, (que estiveram, neste estudo em média, com diâmetros de 1 μm e 2 μm respectivamente) no entanto, maiores taxas de crescimento e produtividade e taxas de remoção de nutrientes, foram observadas em *D. subspicatus*, possivelmente pelo caráter adaptativo fortemente manifestado nesta espécie, notado por uma drástica redução do tamanho das colônias e do tamanho celular.

Levy; Stauber, & Jolley (2007), em seu estudo sobre a sensibilidade de microalgas marinhas à presença de metais, observou que organismos dentre 3 a 20 μm contabilizavam 90% do extrato, e esses foram responsáveis por uma maior e mais rápida captura dos poluentes do meio devido a suas maiores relações superfície/volume e elevadas taxas de crescimento.

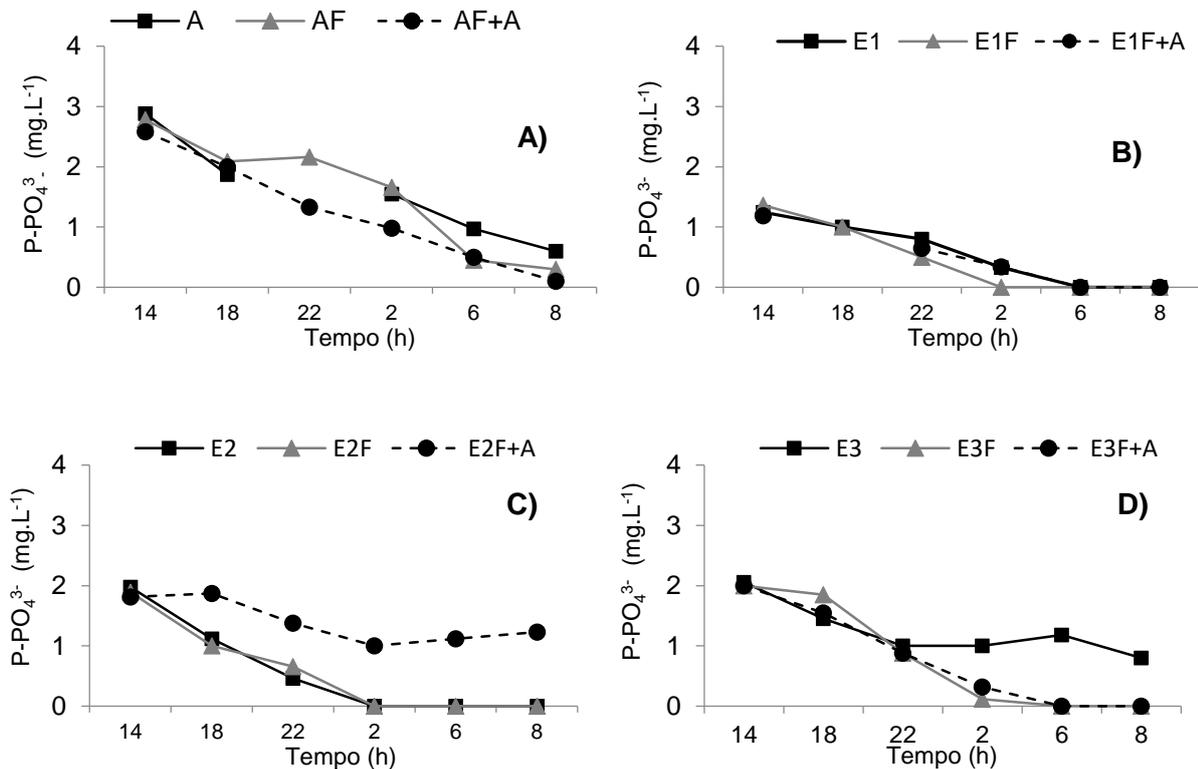
Dessa forma, sugere-se que nos efluentes onde a relação C:N inicial foi mais próxima ao desejável para o crescimento máximo (A e E1) de microalgas, *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, apresentaram células de tamanho reduzido, e no caso de *D. subspicatus*, as colônias podem se desenvolver de modo fragmentado. Esse fato, leva a crer que a relação C:N no início do cultivo, é um dos fatores limitantes para desenvolvimento de estratégias de desempenho máximo por células microalgais. Além disso, para avaliar a captura de nutrientes nas primeiras horas de cultivo um perfil de 24h foi realizado com intervalo de coleta de 4h para ambas as espécies em todos os tratamentos, conforme Figuras 20, 21, 22 e 23 abaixo:

Figura 20 - Remoção de N-NH_4^+ por meio de *D. subspicatus* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.



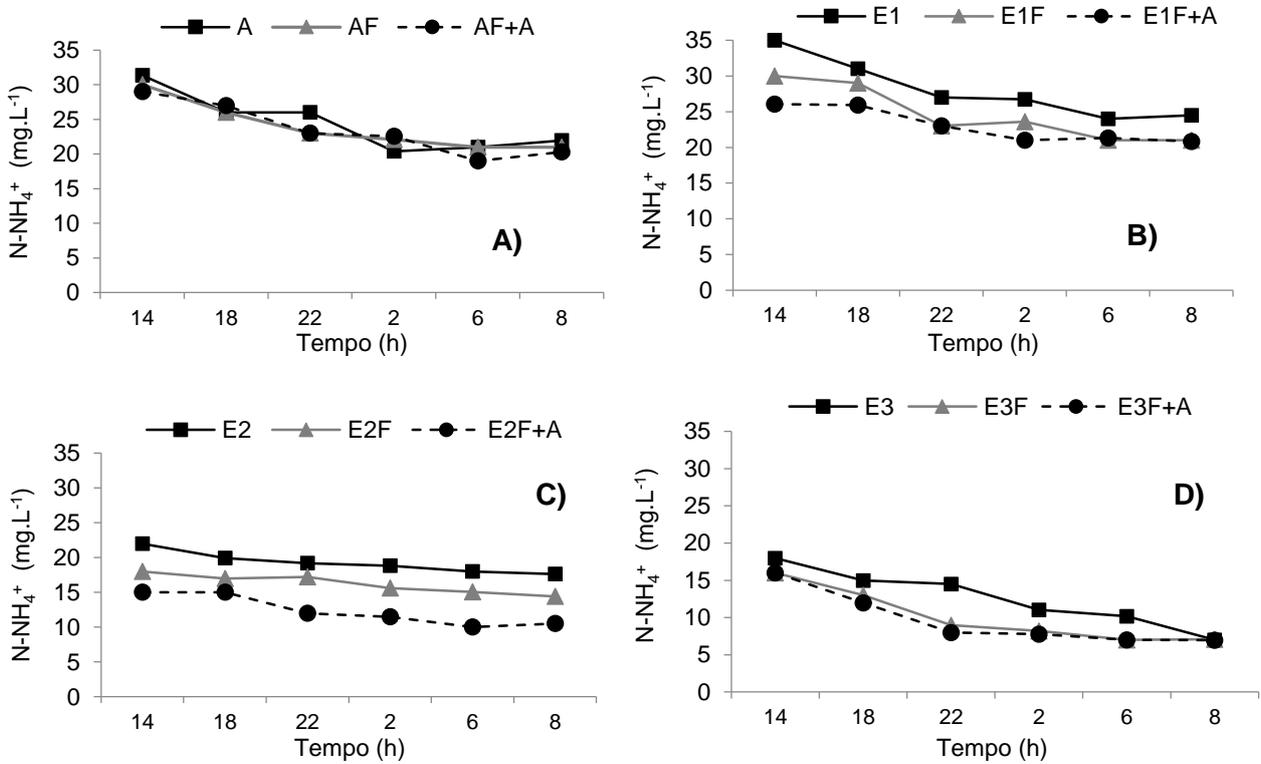
Fonte: A Autora (2019).

Figura 21 - Remoção de P-PO_4^{3-} por meio de *D. subspicatus* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.



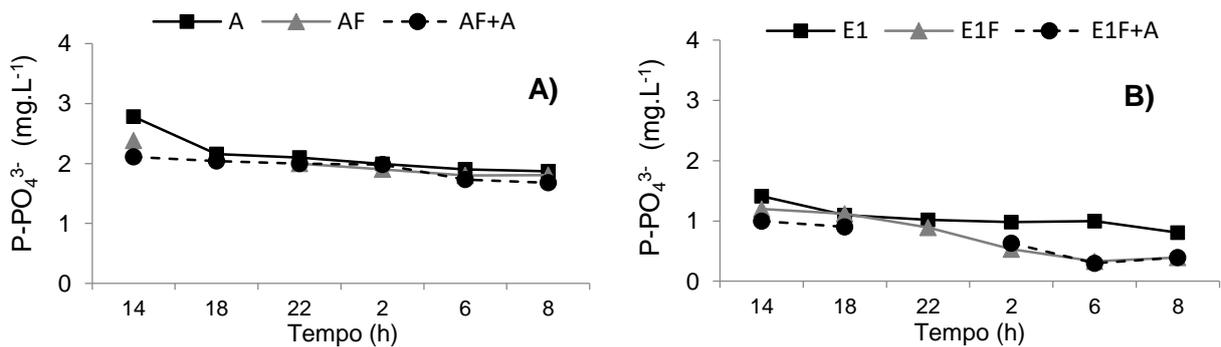
Fonte: A Autora.

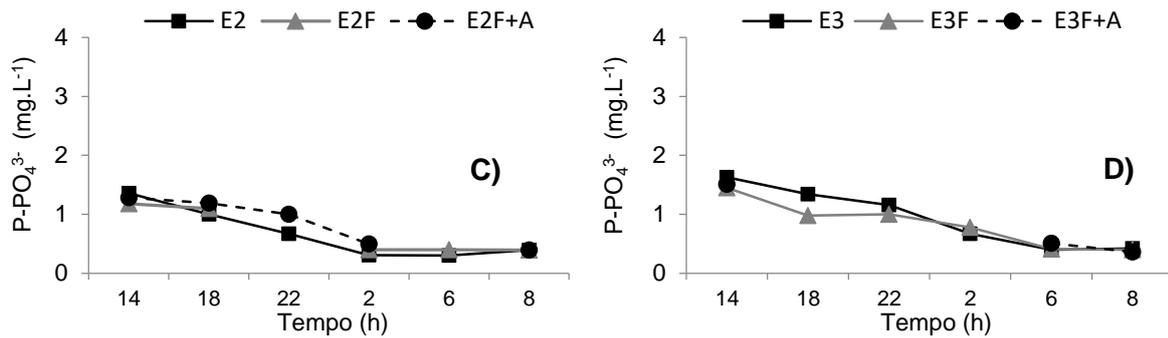
Figura 22 - Remoção de N-NH_4^+ por meio de *C. vulgaris* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 23 - Remoção de P-PO_4^{3-} por meio de *C. vulgaris* cultivadas em A (A) E1 (B), E2 (C) e E3 (D) e seus respectivos tratamentos, durante ciclo nictemeral.





Fonte: A Autora (2019).

Foi observado que *D. subspicatus* reteve aproximadamente entre 27 e 64% de N-NH₄⁺ dissolvida e entre 33 e 100% de P-PO₄³⁻ dissolvido. Já para *C. vulgaris*, a remoção nas primeiras 24h esteve entre 30 e 60% de N-NH₄⁺ e 20 e 76% de P-PO₄³⁻ dissolvido.

Samorì, *et al.*, (2013) em estudo comparativo com *Desmodesmus communi* e um consórcio de microalgas nativas, incluindo *Chorella vulgaris*, ambos cultivados em efluente de diferentes etapas de uma ETE municipal, e em meio comercial constataram que a espécie do gênero *Desmodesmus*, por sí só, foi capaz de promover uma redução de 100% dos nutrientes dissolvidos, especialmente de P-PO₄³⁻ em todos os efluentes avaliados nas primeiras horas do cultivo, independente da relação C:N observada. Concluiu-se nesta pesquisa que a espécie do gênero *Desmodesmus*, tem uma excelente adaptação a efluentes domésticos, mostrando grande vitalidade nesse tipo de efluente ao longo de vários dias de cultivo, devido a um melhor caráter adaptativo, especialmente em efluentes bruto, sem nenhum tipo de tratamento associado, frente à outras espécies já estudadas.

Esses resultados corroboram fortemente com o que foi observado no presente estudo, evidenciando um desenvolvimento ligeiramente melhor de *D. subspicatus* em comparação a *C. vulgaris* nos efluentes testados.

5.1.8 Remoção de DBO dissolvida

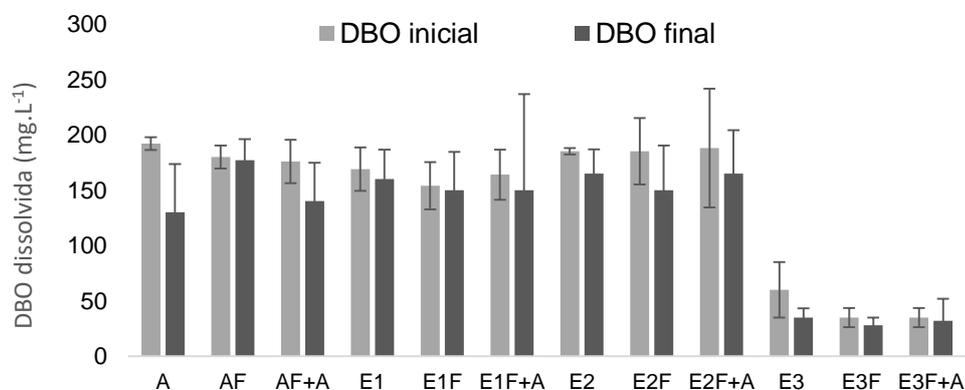
Ambas as espécies avaliadas, provaram ser eficientes na remoção de DBO solúvel do meio de todos os efluentes verificados. As eficiências de DBO dissolvida no meio estiveram entre 71 e 85% e 66 e 86% para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* respectivamente. É importante mencionar, que as culturas foram aeradas para promover um melhor contato entre as cepas e o meio de cultivo e garantir uma exposição mais uniforme das células à fonte de luz emitida.

Portanto, deve ser levado em consideração, que parte da remoção da DBO solúvel, foi conduzida por processos de oxidação através de organismos heterotróficos, presentes em alta densidade nos efluentes não submetidos à pré-tratamento (A, E1, E3 e E3), e aqueles submetidos apenas ao processo de filtração (AF, E1F, E2F, E3F), visto que estes continham densidades consideráveis de micro-organismos heterotróficos. Experimentos paralelos foram conduzidos de modo a avaliar a influência da atividade bacteriana na presença de ar sobre a remoção de DBO solúvel, e serão discutidos na próxima sessão.

5.1.9 Contribuição bacteriana na remoção de DBO dissolvida

Baseado no trabalho de Sutherland *et al.*, (2014), um experimento controle, sem a inoculação de microalgas, mas com as mesmas condições de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) iluminação ($3000 \pm 100 \text{ lux}$) e mistura ($2\text{L O}_2.\text{min}^{-1}$), foi elaborado e acompanhado durante 15 dias, com os meios de cultivo onde haviam células bacterianas (A, AF, E1, E1F, E2, E2F, E3 e E3F). Para o experimento foram utilizadas garrafas do tipo borosilicato com volume útil de 1L. A DBO dissolvida foi avaliada ao final do experimento. Nota-se que houve redução da DBO dissolvida quando não houve inoculação de microalgas nas garrafas reatores. A eficiência de remoção variou entre 2 a 40%, estando essa remoção associada a processos de oxidação, já que as condições do teste foram de aerobiose (Figura 24).

Figura 24 - Contribuição da remoção de DBO dissolvida via processos de oxidação. Experimentos sem microalgas. DBO_0 : inicial e DBO_f : final.



Fonte: A Autora (2019).

Avaliando isoladamente os resultados obtidos no experimento controle, sem microalgas, pode-se dizer que uma parte considerável de DBO (pelo menos 40%), pôde ser removida por processos de oxidação bacteriana da matéria orgânica solúvel, sob condições de aeração.

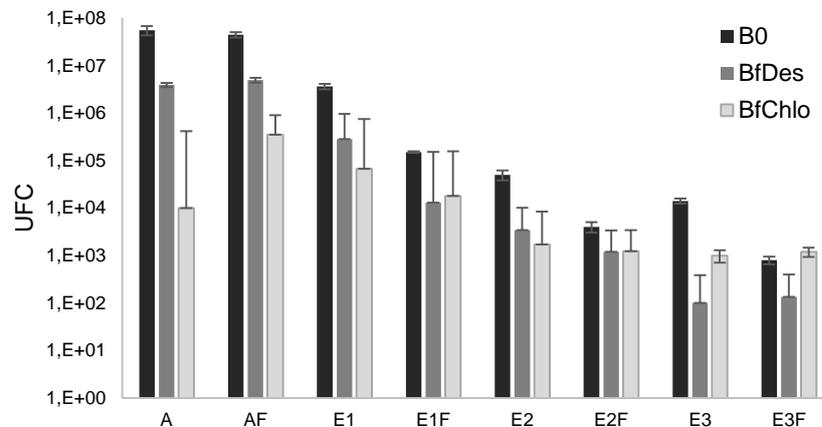
No entanto, alguns estudos envolvendo o crescimento de microalgas em consórcio com bactérias heterotróficas, indicam que a remoção de DBO solúvel, nesses casos, pode se dar majoritariamente por meio das microalgas.

Mayo e Noike (1996) declararam que há evidências de que bactérias heterotróficas crescem menos vigorosamente na presença de microalgas verdes, do que em sua ausência. A explicação para esta inibição no crescimento das bactérias pode ser devido à competição pelo substrato ou liberação, por meio das microalgas, de substâncias – que podem ser tóxicas às bactérias. Em estudo realizado em lagoas de alta taxa contendo alta densidade de microalgas Mayo e Noike (1996), declaram que bactérias heterotróficas podem ter papel pequeno na degradação de matéria orgânica. Neste estudo, concluiu-se que o metabolismo bacteriano da glicose diminuiu significativamente a valores de pH acima de 8,5 e 9, quando as microalgas realizam intensa atividade metabólica. Vale destacar que pH entre 8 e 10 foram frequentemente observados neste estudo.

De modo complementar, verificou-se a densidade bacteriana remanescente no líquido ao final do experimento dos diferentes efluentes contendo *D. subspicatus* e *C. vulgaris*. Constatou-se uma nítida diminuição da densidade bacteriana na maioria dos meios de cultivo, especialmente na presença de *C. vulgaris*. Essa diminuição esteve numa proporção de pelo menos 10^3 Unidades Formadoras de Colônia UFC (Figura 24), e conforme destacado na Tabela 14.

Diante dessa constatação, pode-se dizer que *C. vulgaris* e *D. subspicatus* foram mais responsáveis pelo metabolismo da matéria orgânica do que bactérias heterotróficas nos esgotos avaliados, concluindo-se que a atividade bacteriana, pode ter sido reduzida diante do processo de fotossintético.

Figura 25 - Densidade Bacteriana inicial (B_0), e final, após 15 dias de cultivo (B_f), para *D. subspicatus* e *C. vulgaris*.



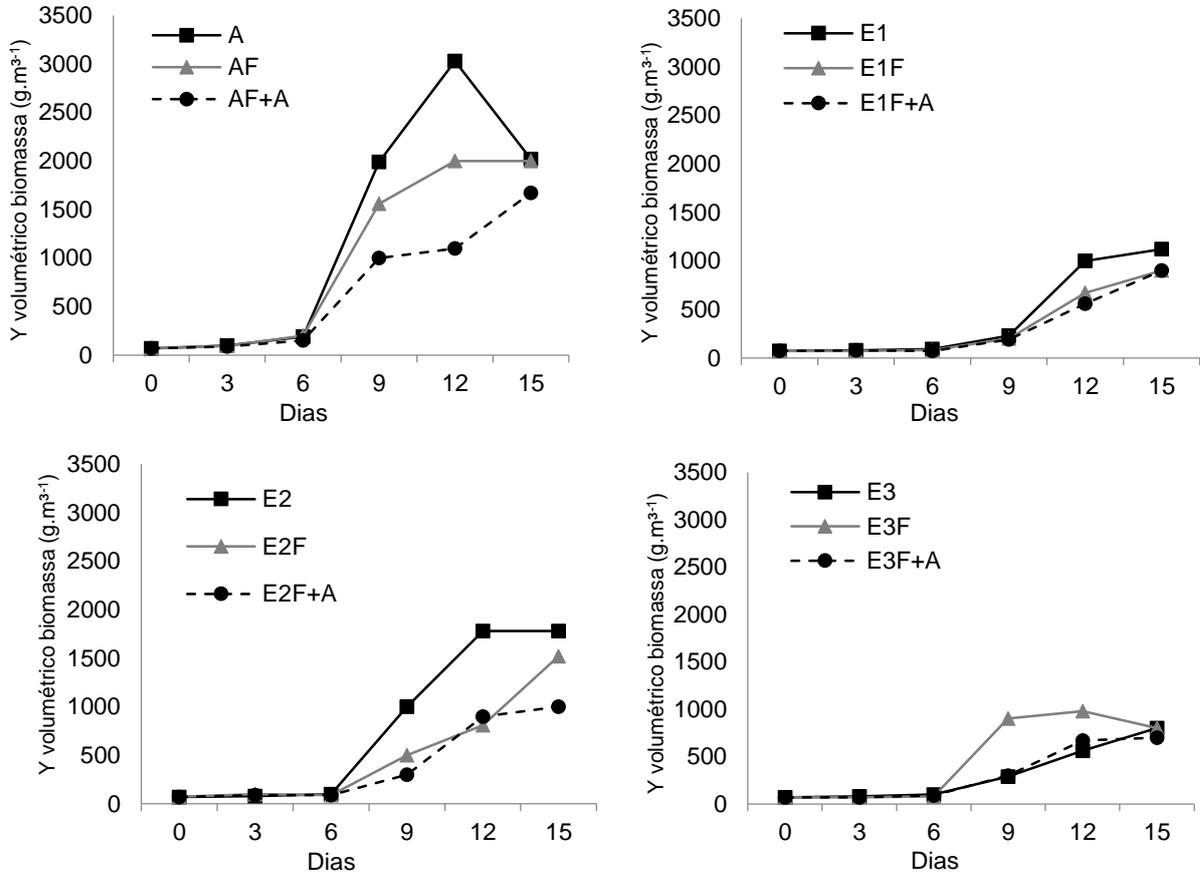
Fonte: A Autora.

Dessa forma, pode-se sugerir que a diminuição da densidade bacteriana, pode estar ligado a liberação de possíveis substâncias nocivas ao seu metabolismo por meio das microalgas. Segundo Mayo e Noike (1996), a liberação de substâncias por microalgas verdes, como a clorelina, podem ter ação bactericida e atuar de modo a deter o crescimento de bactérias no meio, fazendo do ambiente mais favorável ao domínio de microalgas. Alguns fatores que desencadeiam a liberação dessas substâncias, podem estar associados a fatores de estresse, como por exemplo, altos valores de pH e temperaturas superiores à 30°C. Algas e bactérias competem pelo substrato até mesmo no esgoto bruto. As possíveis fontes de matéria orgânica no esgoto doméstico, as quais são diretamente assimiláveis pelas algas e bactérias, incluem pequenas moléculas orgânicas, tais como, ácidos orgânicos, monossacarídeos, aminoácidos etc.

5.1.10 Rendimento de biomassa e estocagem de óleo total

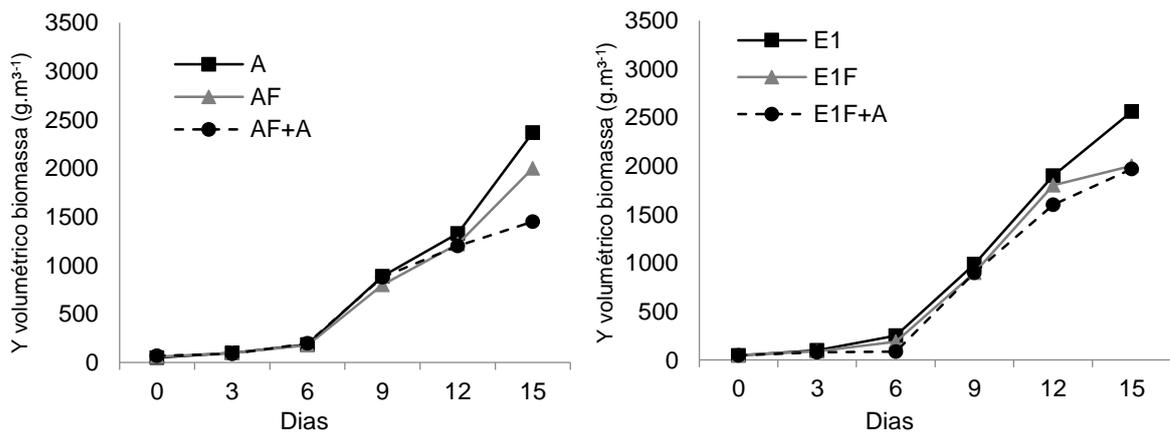
Um perfil temporal de rendimento da biomassa em cada um dos cultivos, foi realizado a fim de se avaliar a dinâmica de produção de biomassa ao longo do tempo. As Figuras 26 e 27 abaixo, apresentam o rendimento volumétrico de biomassa em *D. subspicatus* e *C. vulgaris*:

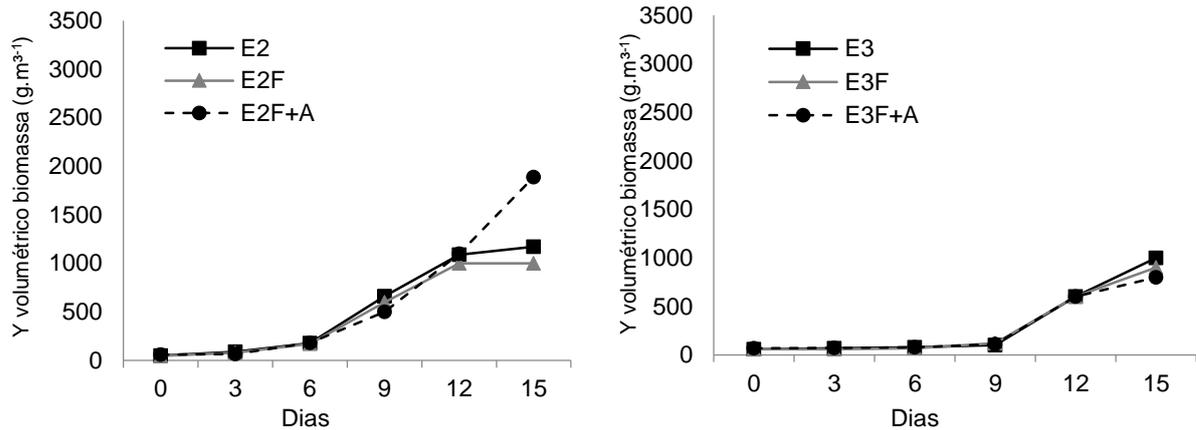
Figura 26 - Rendimento volumétrico de biomassa de *D. subspicatus*.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 27 - Rendimento volumétrico de biomassa de *C. vulgaris*.





Fonte: A Autora (2019).

Um mais alto rendimento de biomassa, favorecido por relações ótimas de C:N, foram observados nos efluentes A e E1 para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* respectivamente. Mais baixos rendimentos de biomassa em E3, foram também relacionados a mais baixas relações C:N.

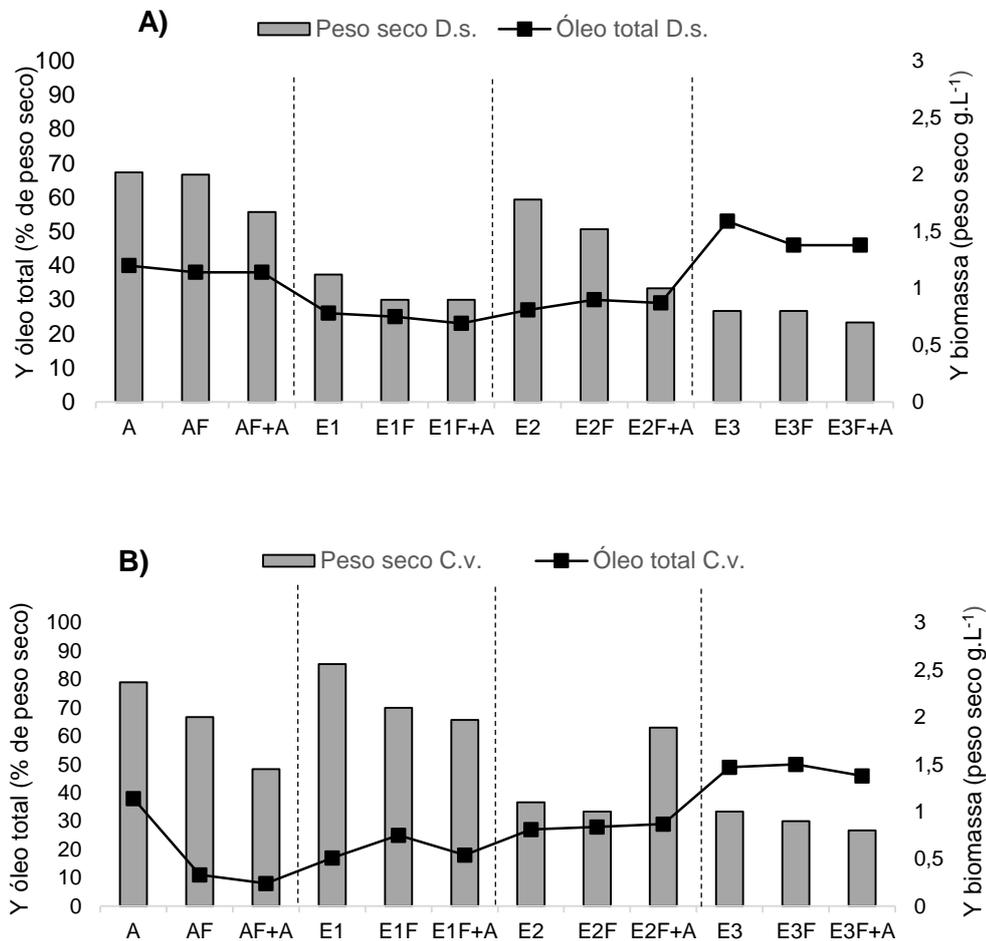
A escassez nutricional promove mudanças metabólicas, nas quais, diminuem a formação de compostos protéicos e clorofilados das células, e conseqüentemente sua taxa de multiplicação, afetando o crescimento e a produtividade. Por outro lado, há um acréscimo na produção de substâncias de reserva no interior da célula, tais como carboidratos, produzidos nos primeiros dias de escassez ou lipídeos, produzidos posteriormente, nos quais os organismos se utilizam em casos de depleção prolongada de nutrientes no meio, garantindo assim, sua sobrevivência e manutenção celular (BERTOLDI, 2008; LI *et al.*, 2011).

Xin *et al.*, (2010), sugerem que o incremento do rendimento de óleo intracelular, pode ocorrer, por exemplo, com limitação de nitrogênio em concentrações a partir de 2,5 mg.L⁻¹ e fósforo a partir de 0,1 mg.L⁻¹ no meio de cultivo. Partindo dessa concepção, a biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, estiveram em ambiente escasso – de pelo menos um dos nutrientes - a partir de aproximadamente o 2º e 4º-5º dia, respectivamente.

O decréscimo celular nos efluentes de E3 iniciou no 8º dia de cultivo para *C. vulgaris* e no 6º para *D. subspicatus*, (Figuras 12 e 13), onde também foi observado a total depleção de nutrientes no meio nos cultivos de ambas as espécies, que permaneceram em ambiente escasso até o 15º dia de experimento. Apesar de se obter um baixo rendimento celular causado pela escassez nutricional, a biomassa de ambas as espécies cultivadas em E3, especialmente *D. subspicatus*, também foram capazes de estocar uma maior quantidade de óleos totais por grama de biomassa produzida, o que possivelmente deveu-se a mudanças metabólicas que

desfavoreceram multiplicação celular, e em contrapartida favoreceram a estocagem de substâncias de reserva – lipídeos (Figura 28).

Figura 28 - Rendimento de óleo total (%) por *D.subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B), em comparação ao rendimento médio de biomassa, cultivadas no afluente bruto, pós UASB, pós lagoa e pós filtros de pedra.



Fonte: A Autora (2019).

No entanto, quando se considera o rendimento total de óleo obtido nos cultivos, a biomassa de A e E1, obtém vantagem frente à biomassa de E3, que embora tenham uma maior capacidade de estocagem lipídica intracelular, seria necessário um cultivo com volume 2,5 e 2,6 vezes maior, respectivamente para que se obtenha um rendimento total similar aos da biomassa de A e E1, já que em E3, a biomassa é escassa.

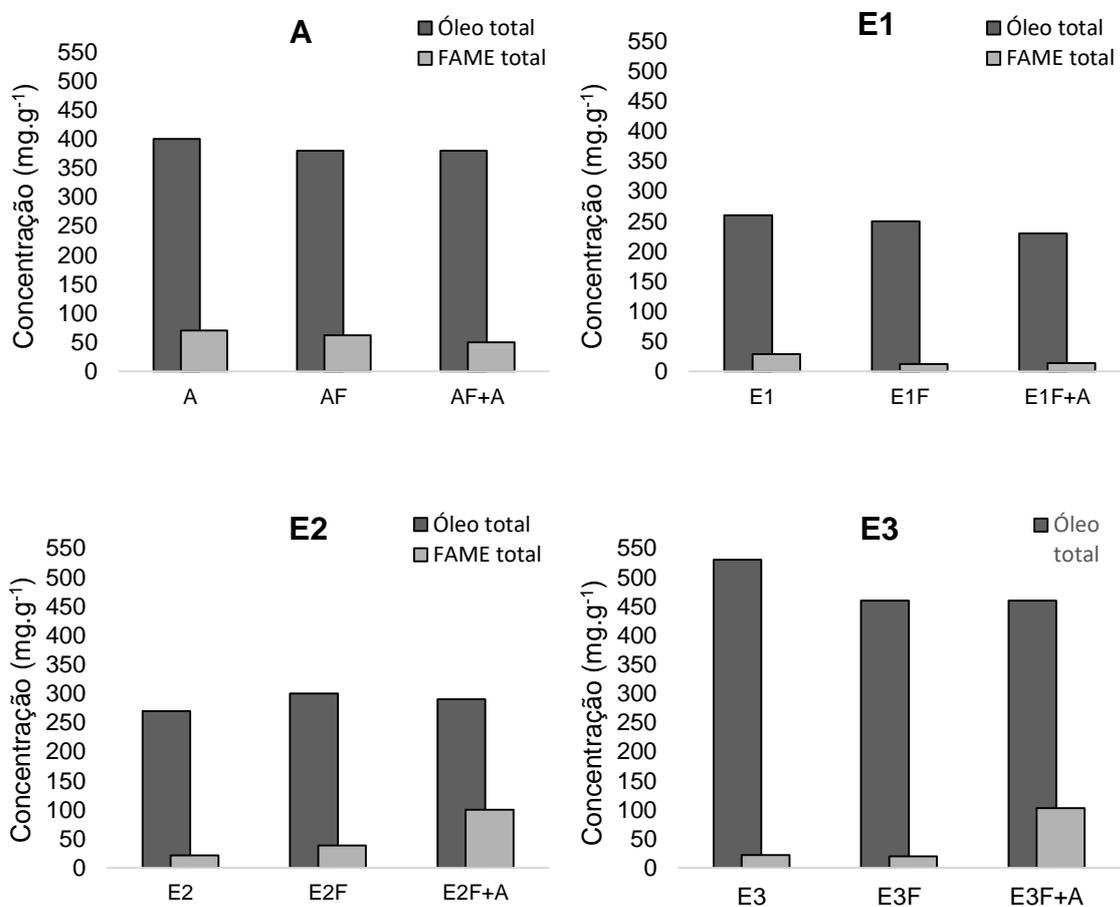
Todavia, em se tratando de uma produção de óleos para fins energéticos, deve se levar em consideração a qualidade do óleo gerado pela biomassa. Um cultivo com alto rendimento de óleo total, por si só, não deve ser um critério de escolha para produção de biodiesel. A qualidade do óleo total gerado, em termos de distribuição de ácidos graxos, deve ser levada em

consideração visto que somente alguns destes ácidos graxos são preferíveis para a produção de biodiesel. A qualificação do óleo total gerado pela biomassa, será discutida no tópico a seguir.

5.1.11 Qualificação do óleo total

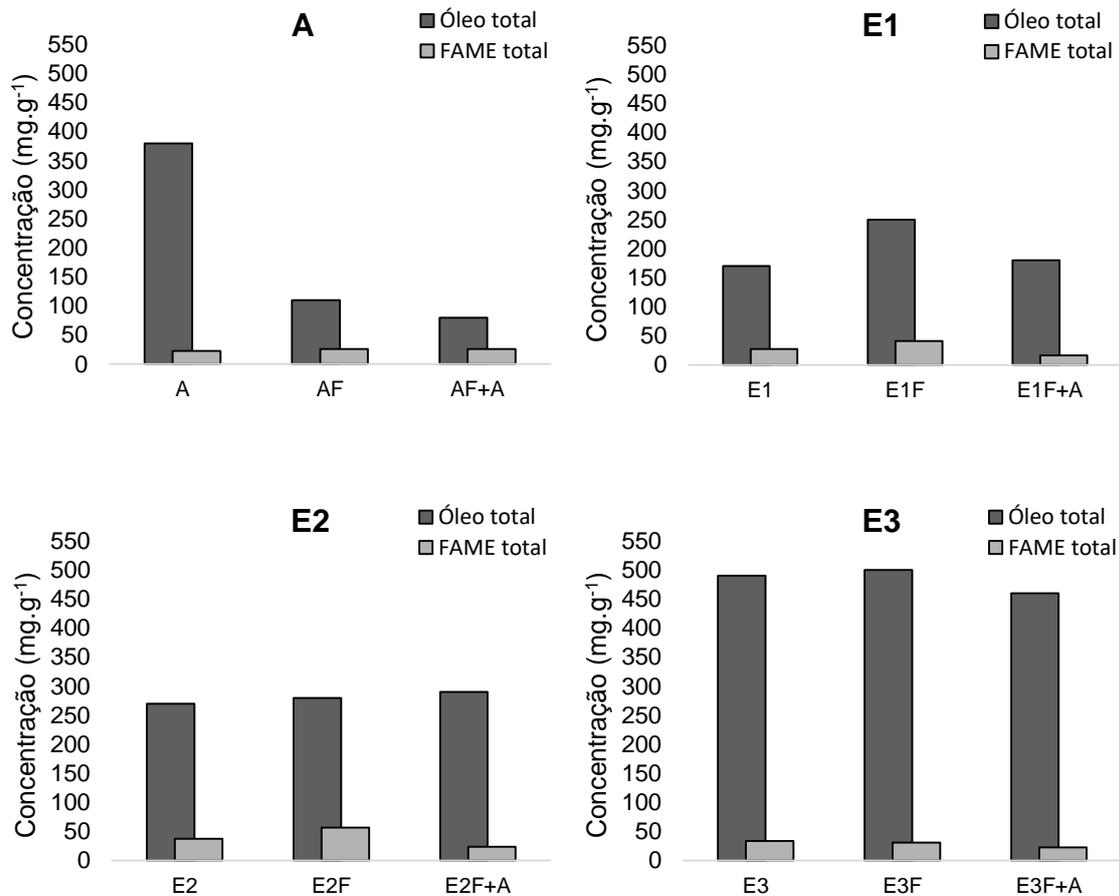
Nos gráficos abaixo, tem-se a quantificação de FAMES produzidos por *D. subspicatus* Figura 29 *D. subspicatus* e Figura 30 *C. vulgaris* em referência à produção de óleo total.

Figura 29 - Concentração FAME e óleo total de *D. subspicatus*.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 30 - Concentração FAME e óleo total de *C. vulgaris*.



Fonte: A Autora (2019).

No geral, a produção de ácidos graxos totais nas células, não ultrapassou a medida de 103 mg.g⁻¹ nas duas espécies cultivadas, sendo observado concentrações de até 5,3 vezes inferior a concentração de óleo total produzido pela biomassa (visto que a produção máxima de óleo total, foi de 550 mg.g⁻¹). Os cultivos realizados com *D. subspicatus*, apresentam concentrações de FAMEs ligeiramente maiores que aquelas observadas em *C. vulgaris*.

Meher *et al* (2006); Brennan (2010), comentam que, ao submeter o cultivo a escassez nutricional, principalmente de nitrogênio é uma estratégia bem conhecida para se estimular a produção de óleos totais das células. O resultado é não somente um aumento da quantidade de óleo total, mas também uma mudança na sua composição, tornando-o mais rico em triacilgliceróis - e conseqüentemente ácidos graxos neutros e mais pobre em ácidos graxos livres estando os triacilgliceróis em uma proporção de pelo menos 1:1 em relação a quantidade de óleo total. Essa mudança favorece a produção de biodiesel.

Sheehan *et al.*, (2018), completam que durante a depleção de nutrientes, as células param de se dividir e os produtos de estoque continuam a se acumular, a uma taxa superior àquela encontrada num ambiente não limitado. Como resultado, a concentração de óleo intracelular, e conseqüentemente a de ácidos graxos pode dobrar ou até triplicar durante essa fase de depleção enquanto ocorre, geralmente, a estagnação ou uma diminuição da multiplicação celular.

Assim sendo, seria esperado um mais alto rendimento de ácidos graxos totais, visto que os cultivos foram submetidos à condições em que a formação de óleos totais, bem como de ácidos graxos, foram favorecidas e a multiplicação celular, desfavorecida.

A explicação para os baixos rendimentos de ácidos graxos na célula, pode também estar relacionado ao mesmo fator que permite a acumulação de óleo intracelular – o longo tempo de escassez ao qual os cultivos foram submetidos, e a necessidade de consumo de ácidos graxos pela célula, como fonte de energia garantindo seu contínuo crescimento, embora em taxas inferiores, mesmo quando os nutrientes se tornaram escassos.

Neste estudo *C. vulgaris* e *D. subspicatus* foram capazes de promover uma acumulação máxima de 52 e 53% respectivamente de óleo total em relação ao peso seco da biomassa. No entanto, vale salientar que os valores de óleo produzido, podem não significar a real taxa de produção, visto que as espécies continuaram a crescer, mesmo diante do período de depleção – a partir do dia 5-6 para N e 2 para P em *D. subspicatus* e 6-7 para N e 2 para P em *C. vulgaris*.

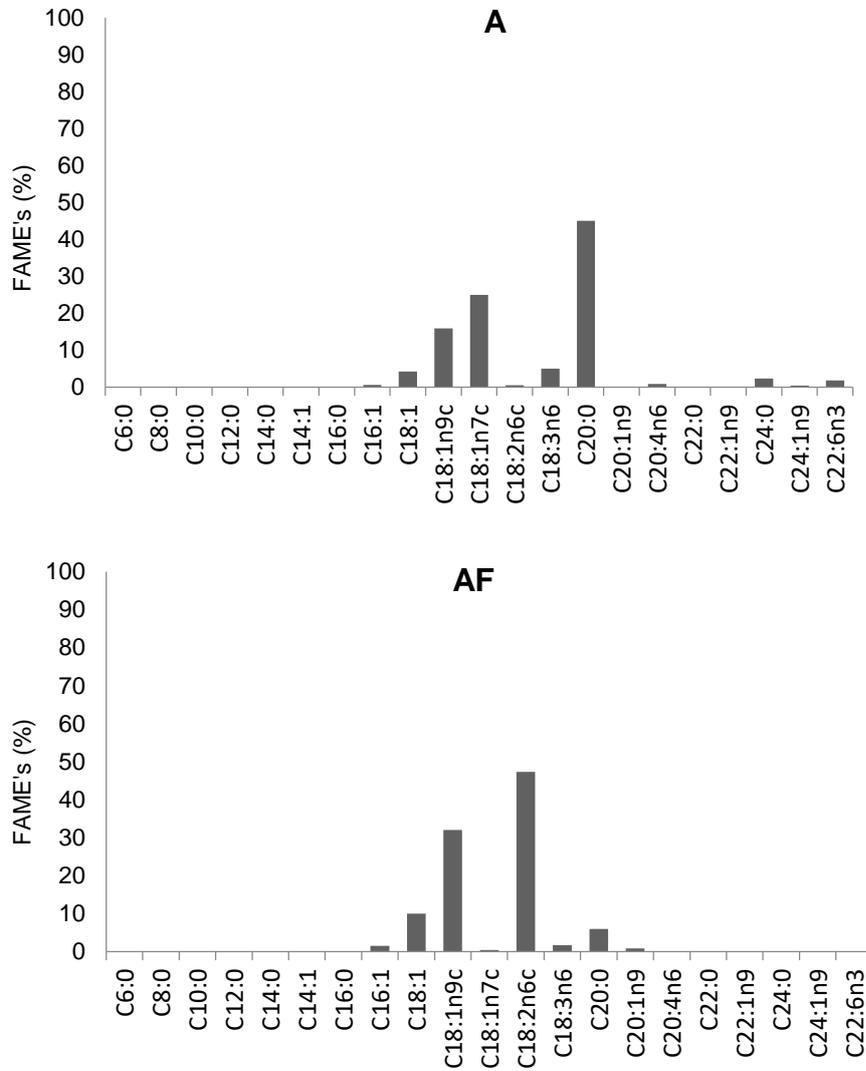
É igualmente válido salientar, sobre a necessidade de avaliação de ácidos graxos em termos quantitativos e qualitativos, em diferentes estágios de crescimento celular (fases *lag*, exponencial, estacionária e de declínio).

Neste estudo, os FAMES foram qualificados e quantificados apenas com as células finais do cultivo, ou seja, da fase de declínio, o que impossibilitou uma avaliação mais acurada sobre o período de maior produção de FAMES na curva de crescimento celular.

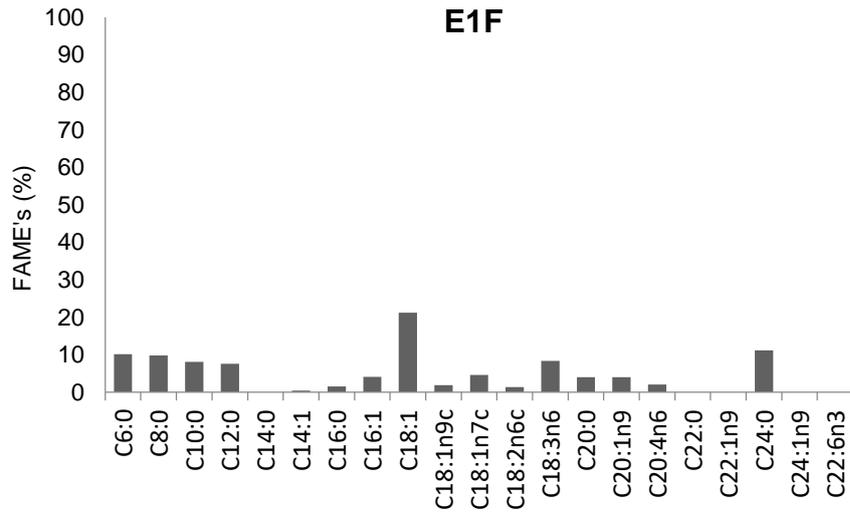
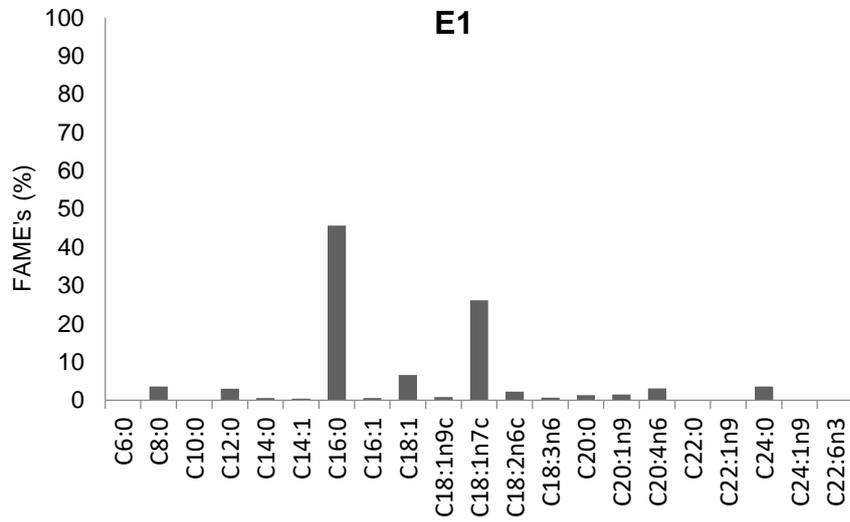
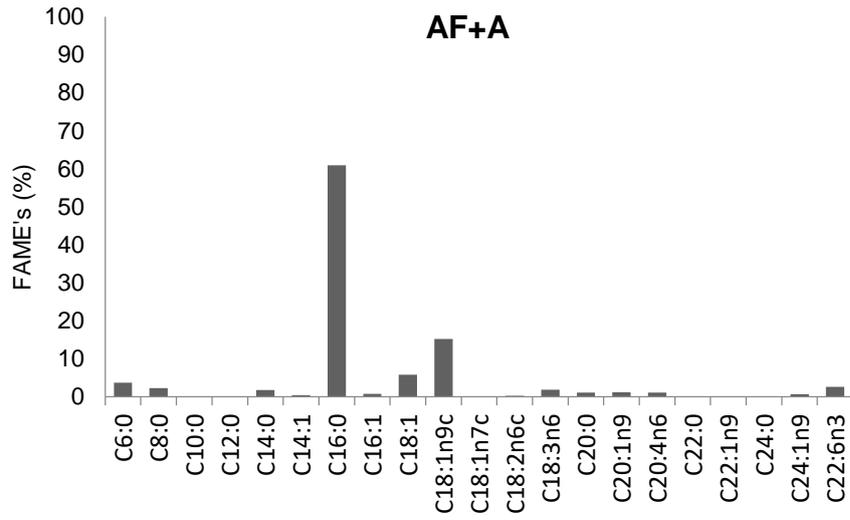
A avaliação dos ácidos graxos quanto à sua composição é de fundamental importância, dada a influência destes sobre as propriedades do biodiesel produzido a partir do óleo gerado. A composição em FAMES pode variar com a espécie da microalga, podendo diferir no tamanho da cadeia carbônica e/ou na presença e na quantidade de insaturações (FRANCO *et al.*, 2013). Dessa forma, a composição dos ácidos graxos obtido pelas espécies, foi distribuído quanto à

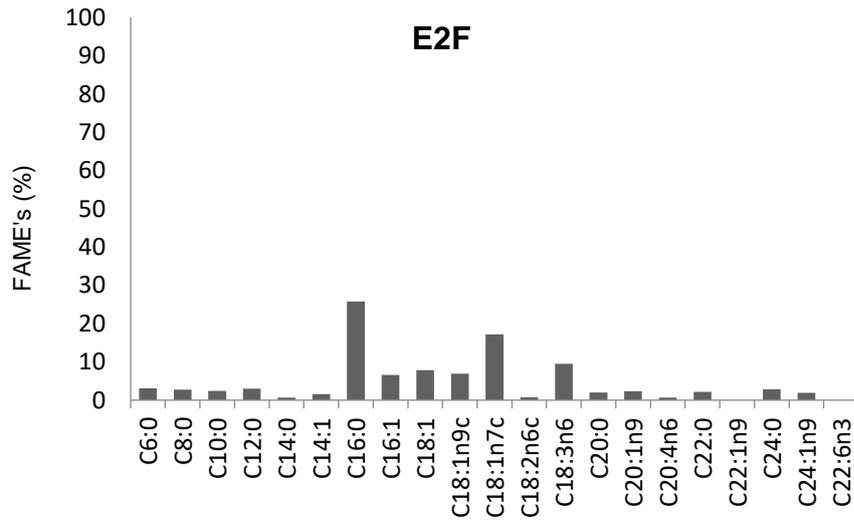
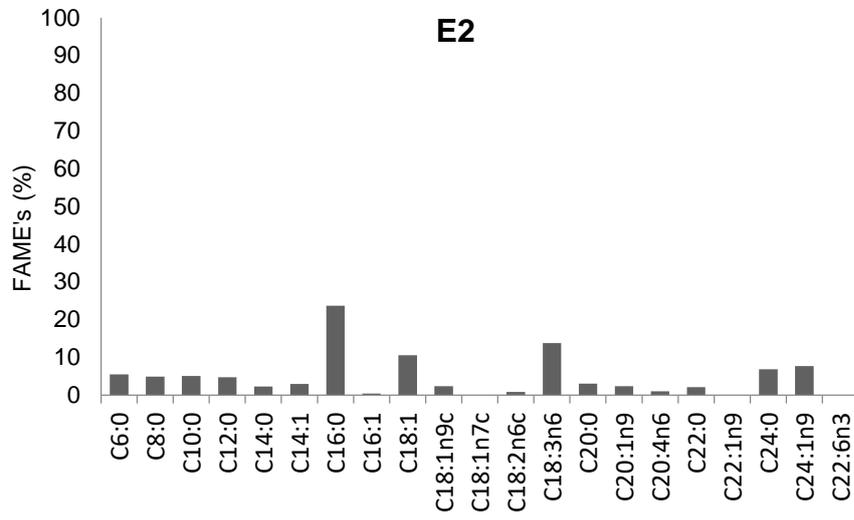
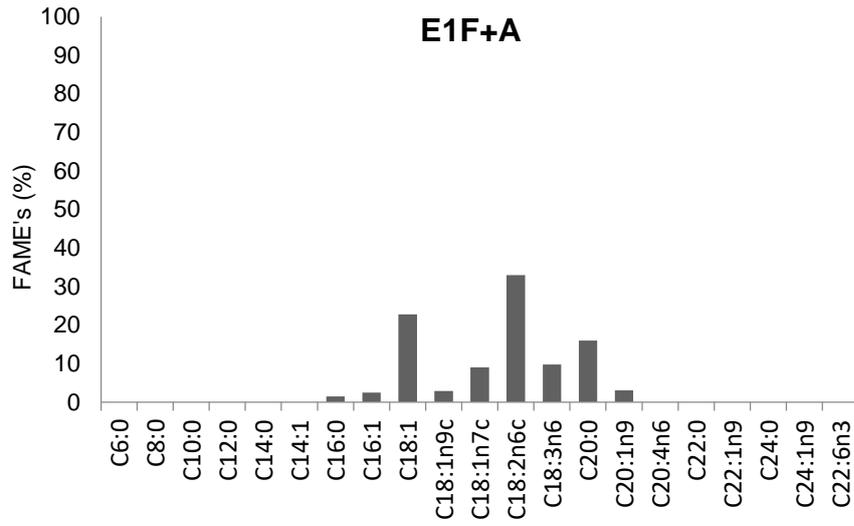
sua percentagem no óleo total produzido, estando esses resultados expressos nas Figuras 31 e 32 abaixo.

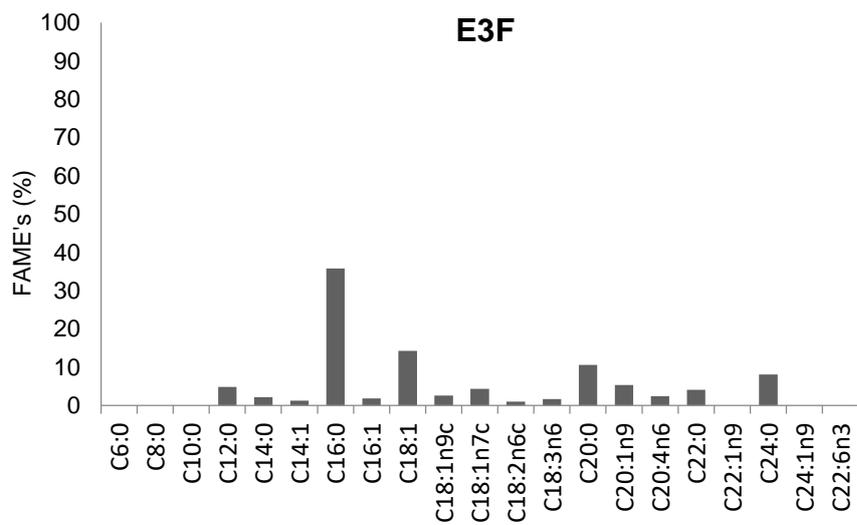
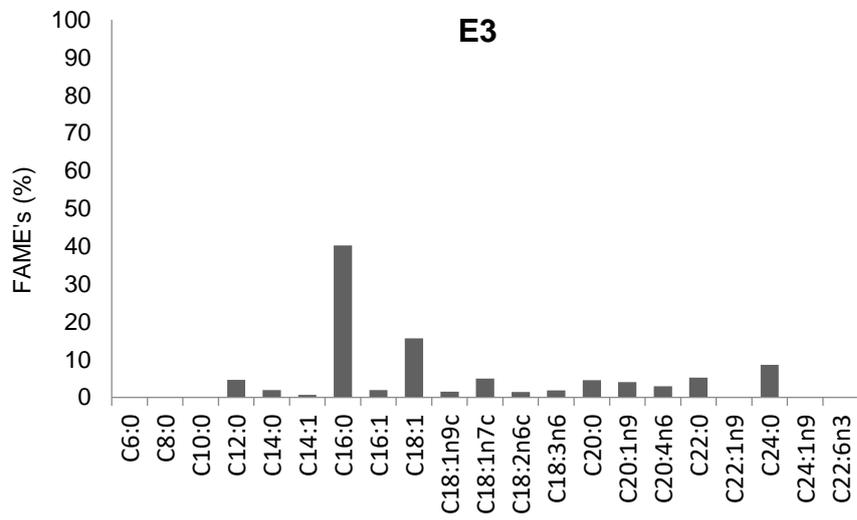
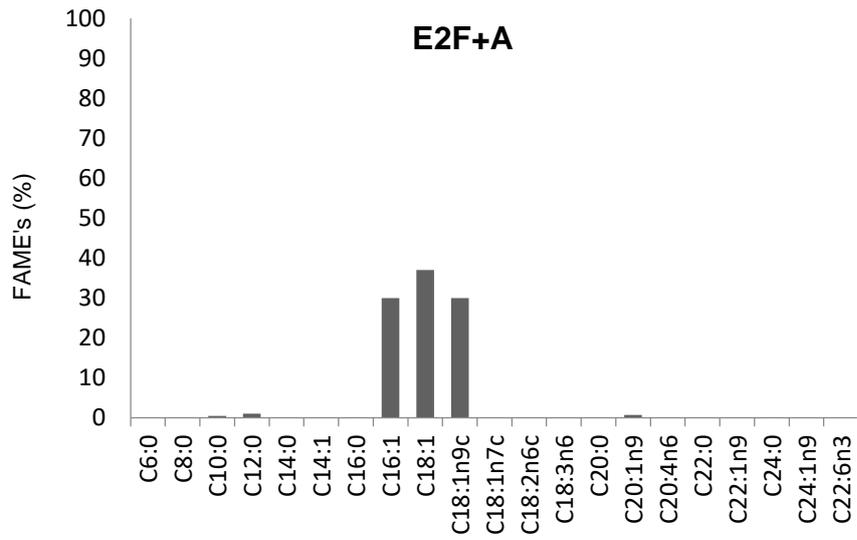
Figura 31 - Composição de ácidos graxos no óleo total produzido por *D. subspicatus* em todas as condições de cultivo.

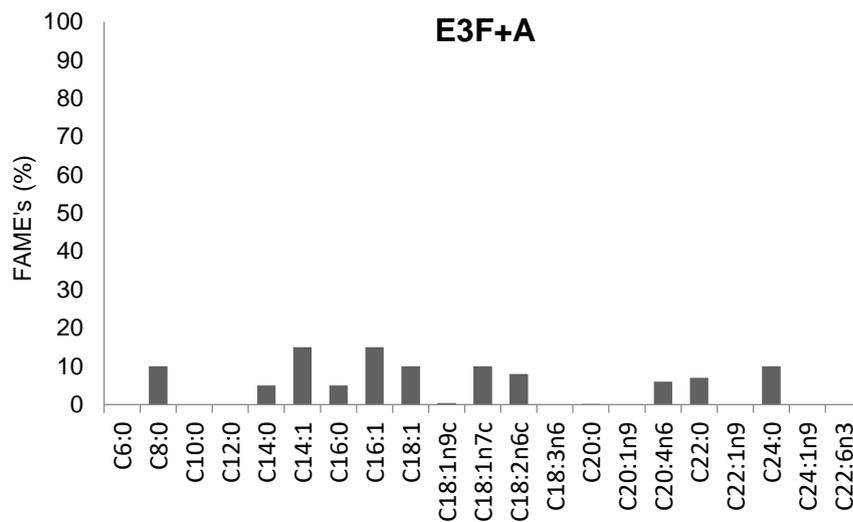


Fonte: A Autora (2019).









Fonte: A Autora (2019).

A partir da avaliação da distribuição dos ácidos graxos produzidos por *D. subspicatus*, verificou-se uma maior produção dos lipídeos contendo cadeias carbônicas entre C:16 e C:18, especialmente no cultivo onde a relação C:N inicial esteve entre 5:1 e 6:1. (A, AF, AF+A e E1F+A). Nos cultivos onde houve uma relação inicial C:N mais desproporcional (daquilo que é considerada uma proporção ótima ao desenvolvimento máximo de microalgas verdes, segundo Benemman (2010), tais como 2:1, 3:1, 10:1 e 12:1, observada em E3F, E3F+A, E3, E2, E2F e E2F+A, a produção de ácidos graxos foi mais distribuída sendo observada formação de lipídeos contendo cadeias carbônicas de 6 a 24 carbonos.

Segundo Hu et al (2008), os ácidos graxos mais comuns produzidos por microalgas verdes, possuem de 16 a 18 átomos de carbono na cadeia da carboxila (cadeias poli insaturadas), o que corrobora com o que foi observado nos cultivos de *D. subspicatus* realizados em A, AF, AF+A e E1F+A, em condição ótima quanto a relação C:N inicial. Dessa forma, pode-se considerar que, para que a espécie *D. subspicatus*, alcance produção de ácidos graxos compatíveis com o que é frequentemente observado em microalgas do grupo *Chlorophyta*, a relação C:N inicial parece ser um fator limitante.

Em contrapartida, lipídeos de cadeias poli insaturadas, são mais susceptíveis à oxidação sendo este um aspecto negativo no que diz respeito ao armazenamento do biodiesel.

Estudos realizados por Gunstone e Hilditch (2016), que mediram a taxa relativa de oxidação dos ácidos oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3), constatou-se que a proporção desses óleos, quando presentes, não deve superar 1:12:25 respectivamente, para que

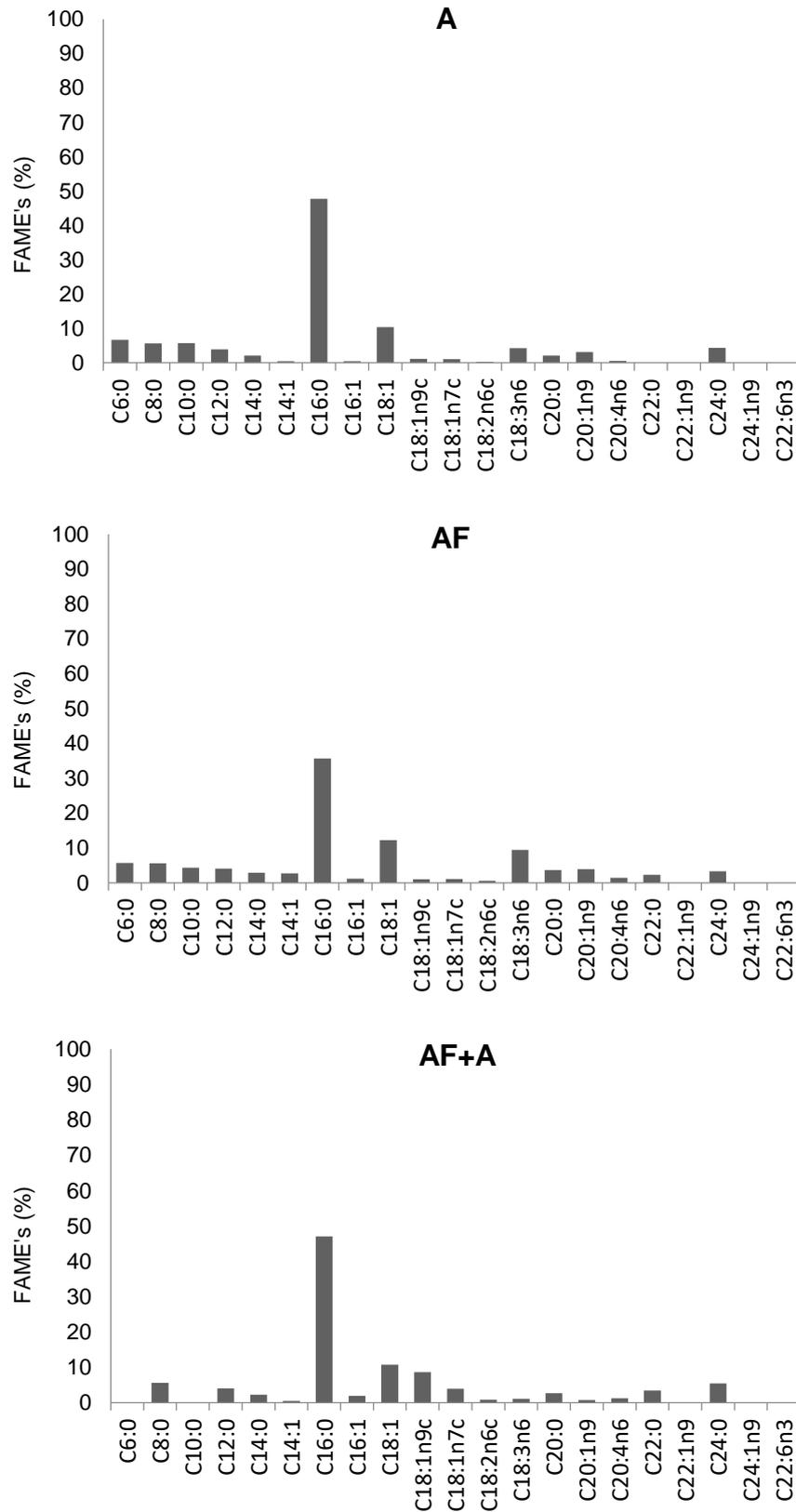
se garanta a estabilidade do combustível quando produzido por matérias primas contendo tais ácidos graxos.

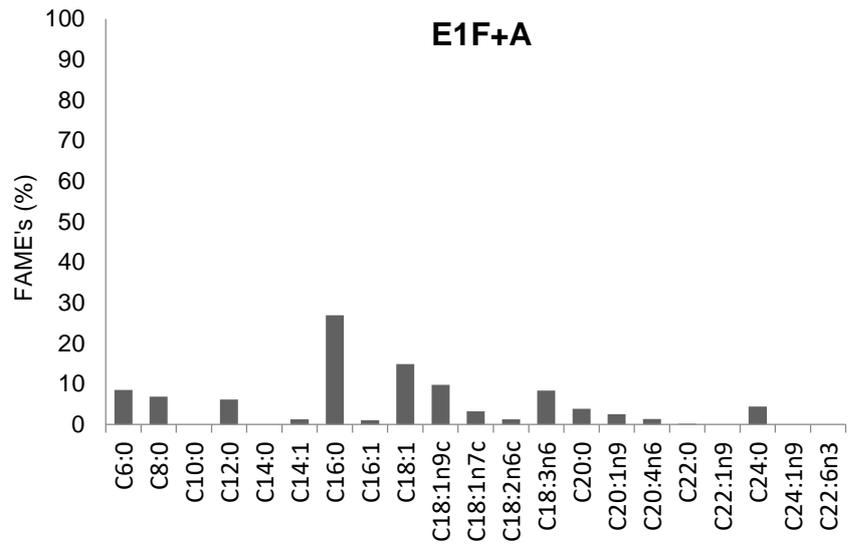
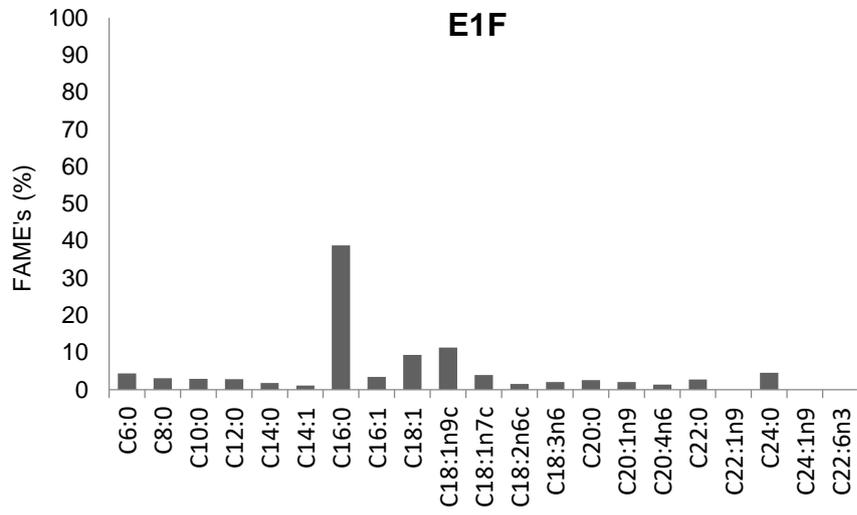
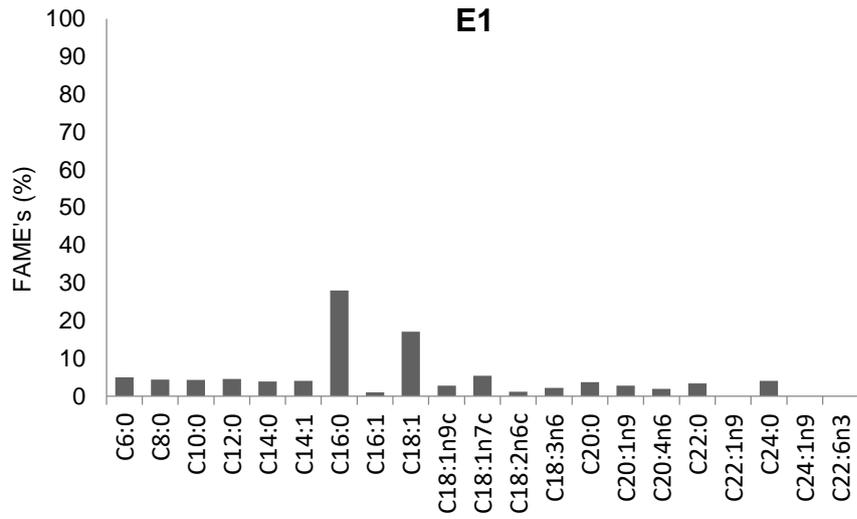
Sendo assim, vale ressaltar que a presença de ácidos graxos de cadeia carbônica de 18 carbonos, especialmente o FAME 18:3, nem sempre é uma opção favorável à produção de biodiesel. Deve se levar em consideração a proporção desses FAMES no meio, para se propor a aplicabilidade do óleo na produção do biodiesel. No óleo produzido por *D. subspicatus*, não foi observado a presença do C 18:3 superiores à 11% do total de FAMES produzidos.

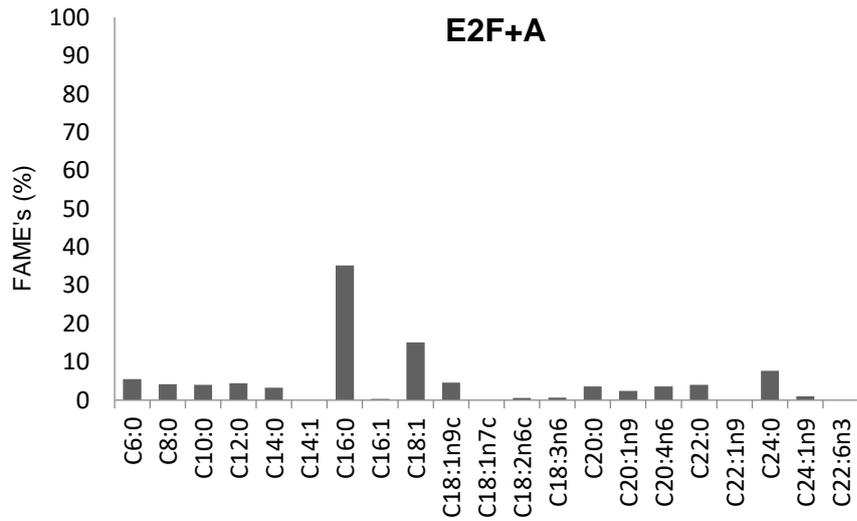
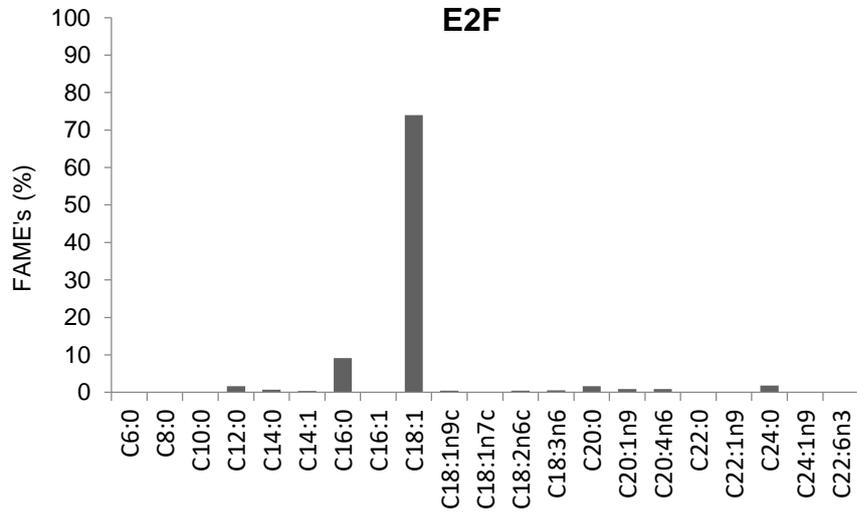
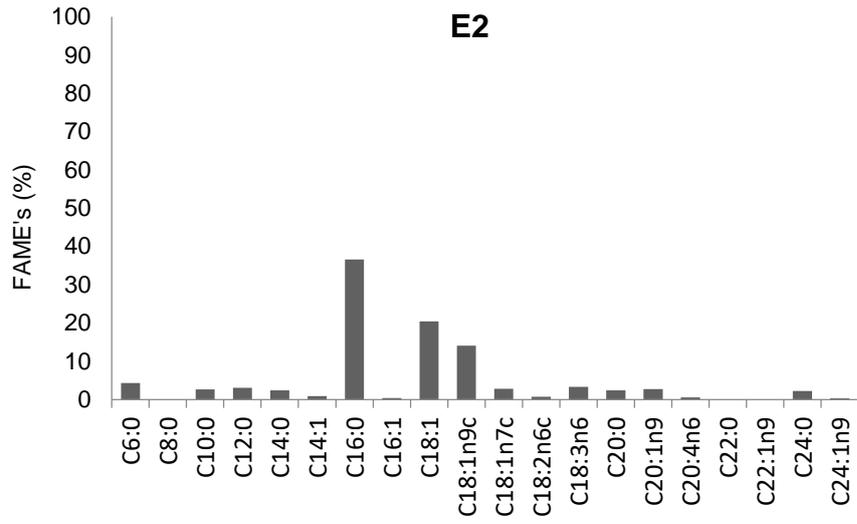
De acordo com Peer *et al* (2008) a produção de um biodiesel de excelência, está condicionada a presença de uma mistura dos ácidos graxos C16:1, C18:1 e C14:0, preferivelmente numa proporção de 5:4:1 ou relações próximas a esta. Tal condição, garante ao biodiesel propriedades como; baixo potencial oxidativo e uma elevada faixa de potência do combustível (elevado número de cetano - octanagem). Dessa forma, sugere-se que, a presença de tais ácidos graxos na matéria prima submetida à produção do biodiesel, é um critério favorável no que diz respeito à qualidade do combustível.

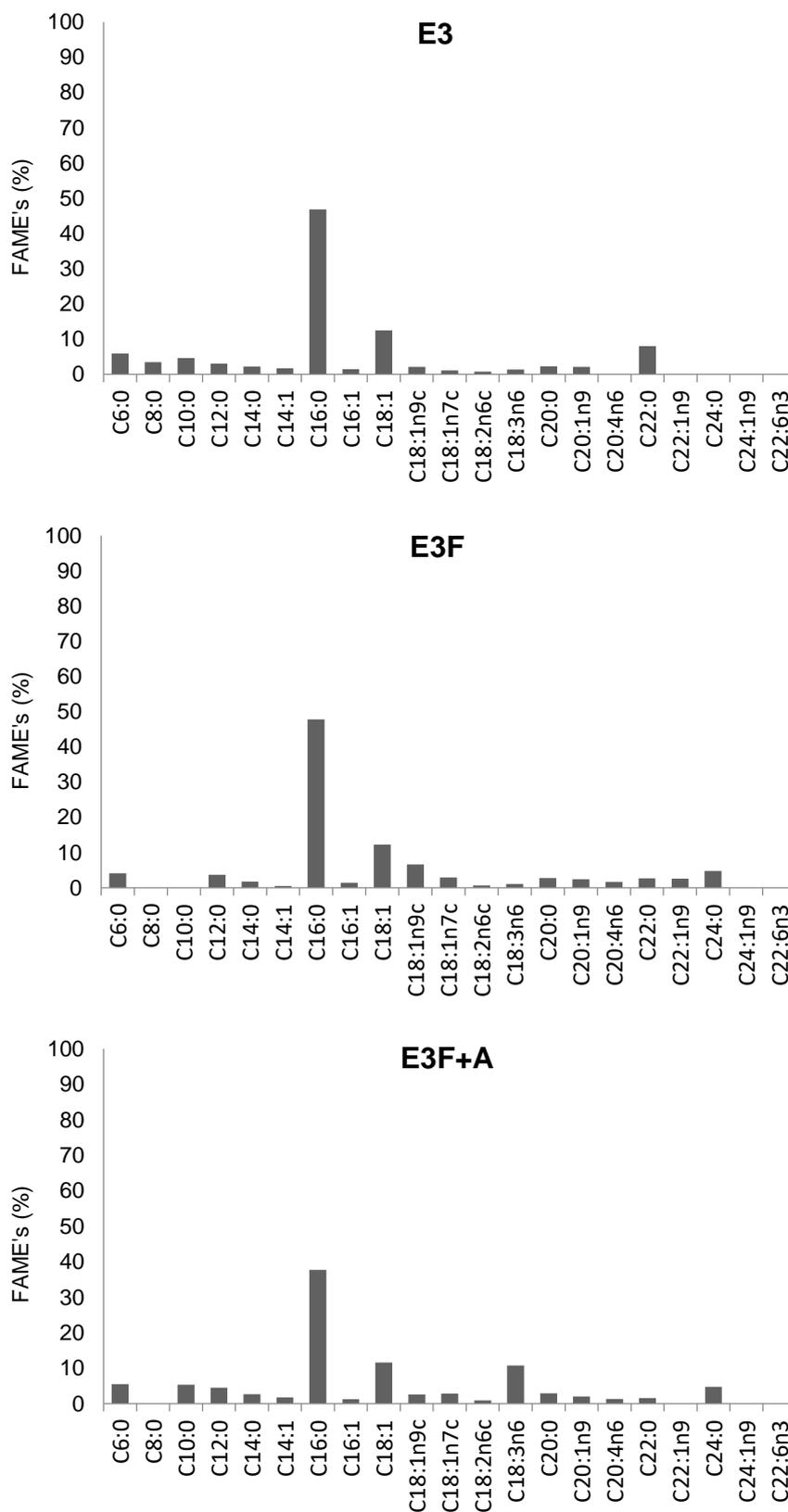
Dessa forma, o óleo produzido por *D. subspicatus*, cultivada especialmente nos efluentes sob condição inicial 6:1 C:N, podem ser indicados à produção de biodiesel com elevado teor de octanagem, principalmente pela presença de ácidos graxos contendo 16 e 18 carbonos. A composição dos FAMES obtido por *C. vulgaris*, foi distribuído quanto à sua percentagem no óleo total produzido, está expresso na Figura 32 abaixo:

Figura 32 - Composição de ácidos graxos no óleo total produzido por *C. vulgaris* em todas as condições de cultivo.









Fonte: A Autora (2019).

Ao se avaliar o cromatograma contendo a distribuição dos FAMES presentes no óleo total de *C. vulgaris*, nota-se uma maior distribuição dos FAMES em relação à *D.subspicatus*. É

possível observar que em todos os cultivos, uma prevalência de produção de FAMES contendo C16:0 e C18:1, havendo também uma reduzida produção de basicamente todos os outros FAMES avaliados.

Essa condição observada no óleo total produzido por *C. vulgaris*, em todos os cultivos, elimina a hipótese da razão C:N como sendo um fator limitante a produção de FAMES em potencial à produção de biodiesel, assim como sugerido para a espécie *D. subspicatus*, que apenas produziu elevados níveis de C16:0 e C18:1, mediante uma condição favorável em termos C:N.

Em contrapartida, quando se compara a produção dos FAMES C:16:0 e C18:1 em termos percentuais, *C. vulgaris* está em desvantagem em relação a *D. subspicatus* pelo fato da produção total ter sido compartilhada dentre outros ácidos graxos.

Franco *et al.*, (2013), relatam que a produção de FAMES, vai depender da espécie de microalga. Uma produção compartilhada de ácidos graxos pode estar relacionada ao tempo de utilização de nutrientes disponíveis no meio. A produtividade de ácidos graxos pela célula, é iniciada mediante um longo período de escassez nutricional,

A espécie *C. vulgaris*, quando comparada a *D. subspicatus*, consumiu os nutrientes disponíveis em um tempo relativamente maior, estando em estado de escassez por um período relativamente menor. Possivelmente essa condição nutricional influenciou a formação de outros FAMES que não aqueles esperados para o grupo taxonômico sob as condições estabelecidas.

5.2 EXPERIMENTO 2: EFEITOS DE VARIAÇÕES DO FOTO PERÍODO NO CRESCIMENTO E ACUMULAÇÃO LIPÍDICA DE *D. SUBSPICATUS* E *C. VULGARIS*

Os seguintes efeitos foram observados nas variações do foto período no crescimento e acumulação lipídica de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*:

5.2.1 Efluentes utilizados no experimento 2

A escolha do efluente doméstico bruto para realização desse experimento, baseou-se nos resultados obtidos no experimento 1, visto que foi o que melhor supriu as demandas nutricionais das espécies.

5.2.2 Características do efluente doméstico bruto utilizado nas Fases I e II.

Os resultados das análises físico-químicas realizadas no efluente proveniente da ETE Rio Formoso estão dispostos na Tabela 18.

Tabela 18 - Características do efluente doméstico bruto utilizado nas Fases I e II.

Efluentes	DBO mg.O ² .L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg. L ⁻¹	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ⁻¹	CE μS.cm ⁻¹	pH	Turb (NTU)	C:N	UFC
Fase I	165±12	31,45±2	3,51 ± 0,2	517	7,03	670	6:1	90x10 ⁶
Fase II	180±9	33± 1	3,30 ± 0,1	-	7,08	830	6:1	75x10 ⁶

Fonte: A Autora (2019).

O efluente bruto, assim como no experimento 01, apresentou características físico-químicas e biológicas comuns a um efluente municipal – baixa carga orgânica, nutricional, pH próximo a neutralidade e turbidez típica, tendo característica de esgoto diluído (METCALF; EDDY, 2012), tendo em vista que foram coletados da mesma Estação de Tratamento de Esgotos – ETE Rio Formoso. As eficiências de remoção de nutrientes e DBO estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19 - Eficiências de remoção das Fases I e II (%).

Fases	Espécies	Cultivos	DBO mg.O ² .L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg. L ⁻¹	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ⁻¹
Fase I	<i>D. subspicatus</i>	Fot.	45	100	100
		Mix.	58	100	94
		Het.	30	99	94
	<i>C. vulgaris</i>	Fot.	45	100	100
		Mix.	53	100	94
		Het.	26	99	94

Fase II	<i>D.</i>	14h:10h	67	100	100
	<i>subspicatus</i>	10h:14h	44	100	100
	<i>C.</i>	14h:10h	33	96	100
	<i>vulgaris</i>	10h:14h	56	100	100

Fonte: A Autora (2019).

A partir dos resultados expostos na Tabela 19, é possível perceber que, na Fase I, *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, obtiveram eficiências semelhantes de remoção, no que diz respeito à DBO, N-amoniacoal e fósforo dissolvido, sendo os cultivos fotoheterotróficos os mais eficientes na remoção de DBO.

Na Fase II, nota-se que para o período mais iluminado (14h:10h), favoreceu maiores remoções de DBO dissolvida para *D. subspicatus*. Já para *C. vulgaris*, a captura de M.O dissolvida no meio foi melhor favorecida quando o período escuro foi mais longo (10h:14h). O foto período não influenciou a captura de N amoniacoal e P dissolvido do meio, que alcançaram eficiências de até 100%. O comportamento da remoção de nutrientes será melhor discutido adiante.

5.2.3 Crescimento da biomassa

Na Tabela 20 abaixo, tem-se a produtividade da biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, em relação e Densidade Celular Máxima (DCM_{ax}), biomassa total ($g.L^{-1}$), clorofila a ($mg.m^{-3}$), óleo total ($mg.g^{-1}$), e ácidos graxos totais ($mg.g^{-1}$), nas Fases I e II do experimento.

Tabela 20 - Produtividade de *Desmodesmus subspicatus* e *Chlorella vulgaris* nas Fases I e II.

Fases	Espécies	Cultivo	DCM_{ax} cel. 10^4	Biomassa total $g.L^{-1}$	Clorofila a $mg.m^{-3}$	Óleo total $mg.g^{-1}$	AG total $mg.g^{-1}$
Fase I	<i>D.subspicatus</i>	Fot.	1655	3,01	380	530	23
		Mix.	2010	3,05	390	560	95
		Het.	1225	1,3	155	21	11
		Pvz.	-	-	222	-	-
	<i>C.vulgaris</i>	Fot.	1788	2,3	333	300	20
		Mix.	1698	2	345	481	80
		Het.	912	0,9	143	20	3
		Pvz.	-	-	222	-	-
Fase II	<i>D.subspicatus</i>	14:10	1222	3,09	402	309	110
		10:14	1900	1,54	333	154	90
	<i>C.vulgaris</i>	14:10	3112	2	301	200	70
		10:14	1902	2,88	389	288	118

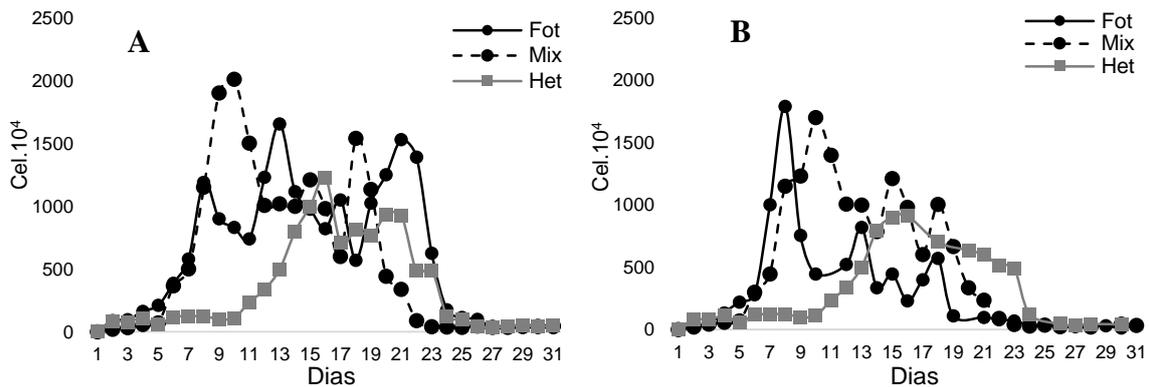
Fonte: A Autora (2019).

A partir dos resultados expressos na Tabela 20, é possível perceber que durante a Fase I, em termos de produtividade, novamente destaca-se o cultivo fotoheterotrófico. Ambas as espécies foram ligeiramente mais produtivas nos cultivos onde houve fases clara e escura.

Em se tratando da Fase II, em termos de produtividade, novamente foram observadas diferenças quando aplicados diferentes períodos claros: escuro. *D. subspicatus* mostrou-se muito mais produtiva quando uma maior fase clara foi aplicada ao cultivo (14h:10h) Claro: escuro. Já *C. vulgaris*, mostrou-se ligeiramente mais produtiva quando uma fase escura maior foi aplicada ao cultivo (10h:14h) claro: escuro. Tais particularidades serão melhor detalhados nos tópicos a seguir.

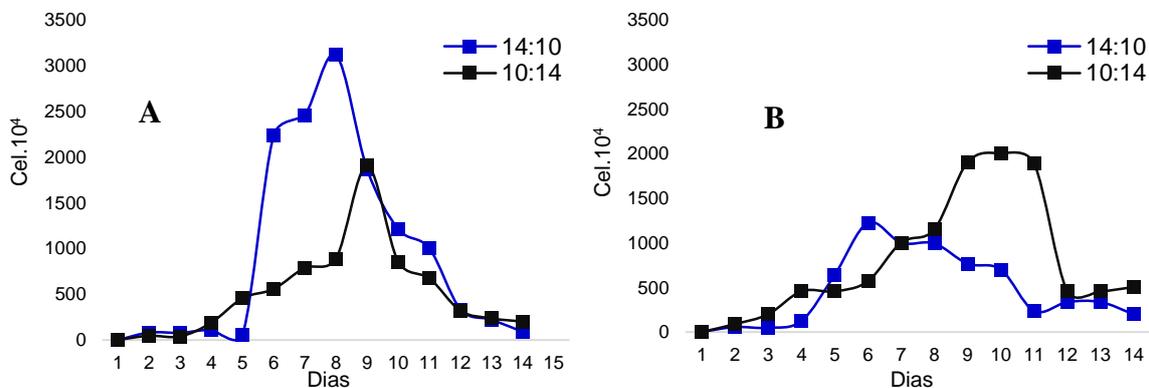
Nas Figuras 33 e 34, tem-se as curvas de crescimento de *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nas Fases I e II.

Figura 33 - Curva de Crescimento de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 34 - Curva de Crescimento de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico (14h:10 e 10:14h) claro:escuro, durante Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Na Fase I, as espécies tiveram um padrão de crescimento semelhante nos 3 metabolismos aplicados, apresentando diversos picos de crescimento. Nos cultivos autotrófico e fotoheterotrófico de ambas as espécies, a fase exponencial, foi observada no 6º dia. Nos cultivos heterotróficos essa fase foi observada apenas no 11º dia. No entanto, outros picos de crescimento foram observados, nos cultivos sob metabolismo autotrófico e fotoheterotrófico, caracterizando múltiplas fases exponenciais. *D. subspicatus* cultivado autotroficamente, apresentou picos de crescimento nos 7º 13º e o 22º dias. Já sob metabolismo fotoheterotrófico, a espécie obteve picos nos 9º e 19º dias. Sob metabolismo heterotrófico, considerou-se apenas um pico após 15 dias de cultivo.

C. vulgaris, que visivelmente obteve menores densidades celular, apresentou um comportamento de múltiplas fases exponenciais apenas sob condição mixotrófica, nos 10º, 15º e 19º dias.

Este comportamento foi associado, ao longo período de cultivo na qual as espécies foram submetidas (30 dias). Dessa forma, exaurindo os nutrientes do meio, a biomassa tendeu a sofrer pequenos declínios de população, sendo a carga de nutrientes parcialmente repostas a partir da matéria orgânica microalgal mineralizada, sentida pelos leves acréscimos de células no cultivo.

Pequenos picos de concentrações de nutrientes dissolvidos (discutido adiante) foram detectadas no meio em períodos após o completo consumo de N e P do meio, fazendo uma sobreposição aos períodos de pico de densidade celular observados nas curvas de crescimento. Assim, esta “auto regulação” das concentrações de nutrientes, estiveram associadas com os picos de densidade celular nos cultivos.

Em termos de morfologia celular, constatou-se que as espécies cultivadas em metabolismo heterotrófico, apresentaram células com alterações morfológicas (formato irregular, com pouca turgidez) e também com mudanças na pigmentação (verde claro turvo a marrom claro), em relação aos cultivos em meios autotrófico, fotoheterotrófico e controles.

Essa resposta dada pelas espécies, leva ao entendimento que, quando o micro organismo é submetido ao metabolismo heterotrófico, utilizando exclusivamente as fontes de carbono e nutrientes disponíveis no esgoto doméstico, a demanda metabólica das espécies não foi suprida, ocasionando baixa produtividade.

Segundo Suh e Lee (2003), cultivos heterotróficos tem mais chances de serem bem sucedidos quando utilizam exclusivamente fontes de carbono orgânico (de fácil bioassimilação) como glicose e acetato e o glicerol, visto que a luz está ausente nesse tipo de cultivo, e os organismos se adaptam a heterotrofia utilizando tais compostos.

Certamente, esses componentes não estiveram presentes no efluente utilizado. As fontes de carbono preferíveis por organismos sob heterotrofia, quando presentes em esgoto doméstico, encontram-se em concentrações reduzidas (glicose), ou mesmo ausente (acetato e glicerol). Fonte de carbono presente no esgoto doméstico, inclui em sua maioria, gorduras e proteínas.

Uma solução, segundo Suh e Lee (2003), seria a adição dessas fontes ao cultivo, promovendo uma maior produtividade das espécies. No entanto, o uso de esgoto doméstico como fonte de carbono, visa promover o tratamento do efluente gerando biomassa com menor custo possível associado, sendo a adição de fontes de carbono algo incoerente.

Sendo assim, uma outra solução pertinente para cultivos heterotróficos utilizando esgoto doméstico que não contenham tais compostos como fonte principal de carbono, devem ser concebidos mediante uma pré-adaptação de linhagens de microalgas no efluente de interesse, visando o sucesso do cultivo. Esta adaptação não foi aplicada neste estudo. Outra solução, seria a mistura de efluentes contendo glicose com efluentes doméstico, de modo a se alcançar razões de carbono e nutrientes, compatíveis com seu desenvolvimento em total ausência de uma fonte de energia (luz).

Apesar de estarem aparentemente, em ambiente impróprio para seu desenvolvimento, as microalgas cultivadas heterotroficamente, obtiveram evoluções em termos de remoção de nutrientes. Embora a taxas reduzidas de crescimento, diminuíram os nutrientes em sua totalidade, e também participaram na redução de DBO dissolvida no meio (30% e 26% para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* respectivamente). Diante desta constatação, assume-se que embora não se alcance alta produtividade em termos de biomassa, as espécies sob metabolismo heterotrófico, foram capazes de promover tratamento razoável (em comparação aos demais cultivos) do efluente no qual foram cultivadas.

Deve se levar em consideração, a participação bacteriana na redução dos níveis de DBO e nutrientes do meio, que, conforme discutido no experimento 1, pode ter atuado de modo

insignificante, dado o natural decréscimo de colônias bacterianas mediante crescimento microalgal (MAYO; NOIKE 1996).

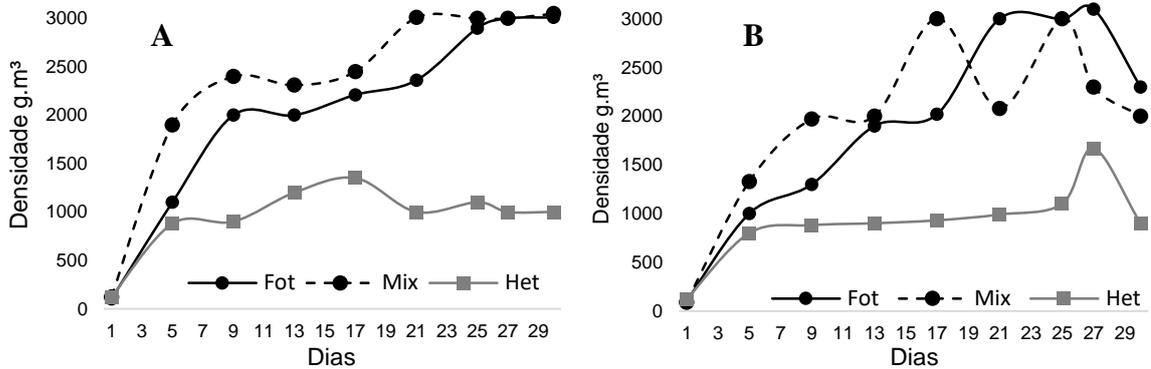
Na Fase II, aplicando-se apenas o metabolismo fotoheterotrófico, no geral, notou-se um melhor desempenho da espécie *D. subspicatus*, que alcançou DCM_{ax} de 3112.10^4 cel.mL no cultivo que recebeu uma maior fase clara (14h:10h). Já *C. vulgaris* alcançou DCM_{ax} de 1900.10^4 cel.mL no cultivo que recebeu uma maior fase escura (10h:14h). Esse comportamento dependente do foto-período, também foi observado para outros aspectos, tais como a captura de nutrientes e o armazenamento de óleo intracelular. Essas respostas refletem uma condição de equilíbrio entre períodos claro-escuro para *D. subspicatus* e *C. vulgaris*, revelando os limites de cada fase, para um maior rendimento em ambas as espécies.

Alguns autores explicam que a adição de luz em quantidade suficiente torna-se um fator limitante para alcançar a produção máxima de algumas espécies (YANG et al., 2000; SUH E LEE, 2003). Cultivos que alcançam populações muito densas tendem a provocar o fenômeno da auto sombra, e tem seu crescimento estagnado, ou não conseguem chegar ao seu limite de rendimento. A introdução de luz suficiente ao limite de cada espécie é um ponto chave para alcançar o rendimento máximo da espécie em termos de biomassa e conseqüentemente produtos de reserva, podendo este aspecto ser prejudicado se esta luz estiver em quantidade excessiva ou reduzida (TREDICI, 2004).

Embora observadas diferenças visuais nas curvas de crescimento das espécies sob diferentes condições, o teste estatístico aplicado, não detectou diferenças significativas no crescimento de *D. subspicatus* cultivado nos diferentes tratamentos ($p = 0,9$). Para *C. vulgaris*, também não foram observadas diferenças entre os tratamentos aplicados ($p = 0,9$) (relatório em anexo).

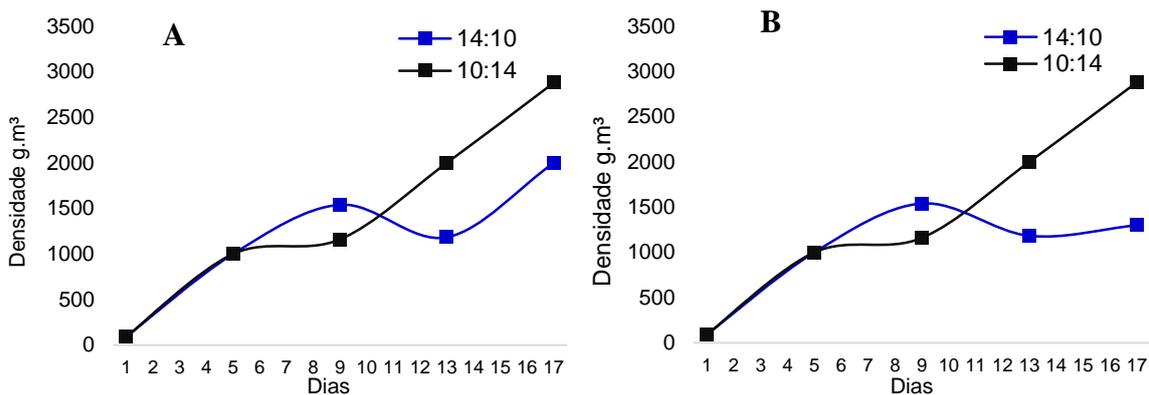
O rendimento volumétrico em peso seco da biomassa de *D. subspicatus* e *C. vulgaris* ao longo do crescimento, cultivados em esgoto bruto, sob metabolismos autotróficos, fotoheterotrófico e heterotrófico nas Fases I e II, estão expressos nas Figuras 35 e 36 abaixo:

Figura 35 - Rendimento volumétrico da biomassa de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) em meios autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico durante a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 36 - Rendimento da biomassa de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) em meios fotoheterotrófico sob condição de iluminação 14h:10h e 10h:14h claro: escuro respectivamente durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Nas Fases I e II, tem-se a representação das curvas de crescimento, no entanto, sem as fases de declínio visto que a quantificação em peso seco, leva em consideração todas as células do cultivo (metabolicamente ativas e inativas).

Na Tabela 21 abaixo, tem-se os aspectos de crescimento para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* (B) em meios autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico (Fase I) e nos foto-períodos 14h:10h e 10h:14h claro: escuro (Fase II).

Tabela 21 - Taxas máximas de crescimento (r) dia^{-1} , produtividade celular média (P) $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, taxa de remoção de N e P (μN e μP) dia^{-1} , duplicações por dia (k) dia^{-1} e tempo de duplicação (T_2) dia^{-1} para *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nos meios de cultivo utilizados no experimento 2.

<i>D. subspicatus</i>							<i>C. vulgaris</i>						
Meio	r	P	μN	μP	k	T_2	Meio	r	P	μN	μP	k	T_2
Fot	1,87	0,103	0,98	0,56	1,98	0,37	Fot	1,75	0,116	0,860	0,88	1,98	0,39
Mix	1,98	0,126	1,15	0,77	2,19	0,35	Mix	1,75	0,127	0,990	0,96	1,98	0,39
Het	0,76	0,035	0,79	0,12	1,01	0,91	Het	0,39	0,031	0,451	0,43	1,00	1,77
14:10	1,98	0,111	0,98	1,16	1,87	0,35	14:10	1,86	0,119	1,112	0,91	1,96	0,37
10:14	1,81	0,102	0,89	0,98	1,18	0,38	10:14	1,93	0,169	0,113	0,98	2,01	0,35

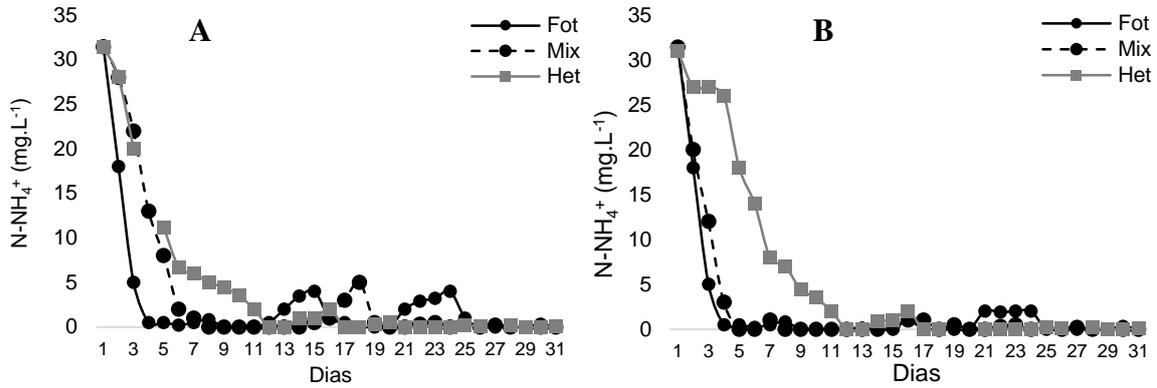
Fonte: A Autora (2019).

Os valores apresentados na Tabela 21, mais uma vez, traduzem o que foi apresentado nas Figuras 32 e 33, exibindo um comportamento das espécies direcionadas ao foto-período em que estão submetidas, sendo *D. subspicatus* mais favorecida, em termos de crescimento na condição 14h:10h, e *C. vulgaris*, na condição 10h:14h claro: escuro.

5.2.4 Remoção de nutrientes

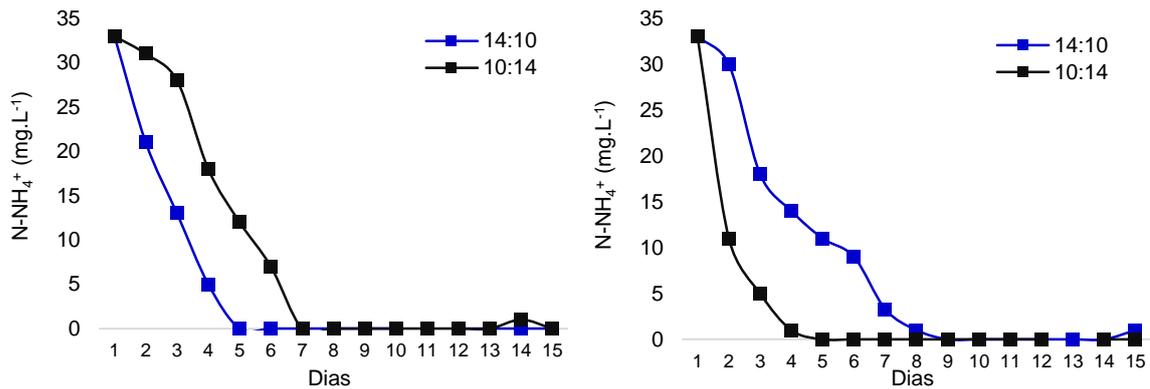
Nas Figuras 37, 38, 39 e 40 abaixo, tem-se os gráficos de decaimento de N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} nos cultivos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico (Fase I) e nos cultivos fotoheterotróficos nas condições de iluminação 14h:10h e 10h:14h claro: escuro, para as espécies *D. subspicatus* e *C. vulgaris*

Figura 37 - Decaimento de $N-NH_4^+$ nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I



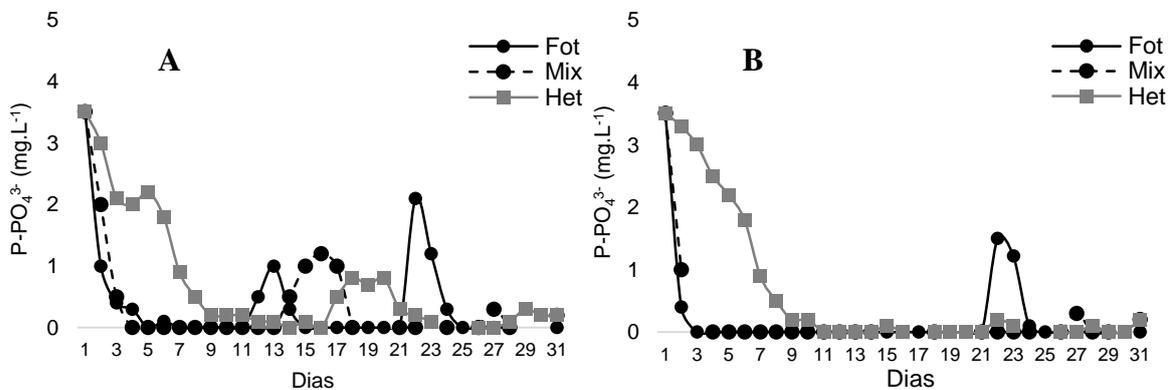
Fonte: A Autora (2019).

Figura 38 - Decaimento de $N-NH_4^+$ nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II. Fonte: A Autora (2019).



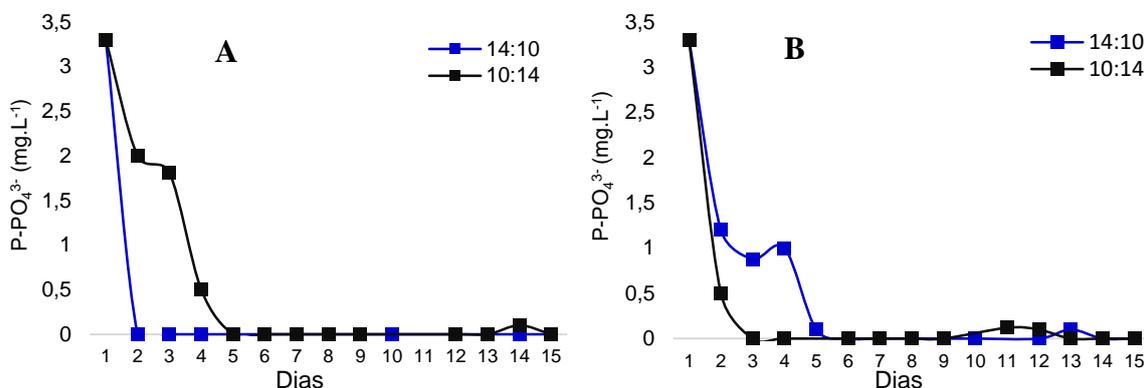
Fonte: A Autora (2019).

Figura 39 - Decaimento de $P-PO_4^{3-}$ nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 40 - Decaimento de $P-PO_4^{3-}$ nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

O comportamento das concentrações de $N-NH_4^+$ e $P-PO_4^{3-}$ nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris*, durante a Fase I estiveram relacionados a morte celular, que foi responsável pela adição contínua de nutrientes ao meio, suprindo também o crescimento de novas células. Esse padrão de acréscimo nutricional, está intimamente ligado ao tempo prolongado de cultivo, que não foi interrompido mediante a primeira fase de declínio. A partir desse comportamento, foi possível observar as estratégias de sobrevivência desenvolvidas pelas espécies, e que são úteis na produção de biomassa em larga escala, tendo em vista os ganhos em termos de rendimento em peso seco ao final dos 30 dias.

PEREZ-GARCIA *et al.*, (2011), explicam que cultivos prolongados, também estão intimamente ligados com a acumulação de óleos intracelulares que não são apenas favorecidos pela escassez nutricional, mas também por longos períodos de cultivo (discutido no tópico a seguir).

A partir de estratégias de sobrevivência, tais como a autossuficiência de recarga nutricional via morte celular e mineralização da matéria orgânica, as células são capazes de se auto alimentar num processo contínuo até a completa exaustão nutricional do meio dada pelo declínio da população. Esse processo caracteriza o que foi observado na Fase I do experimento.

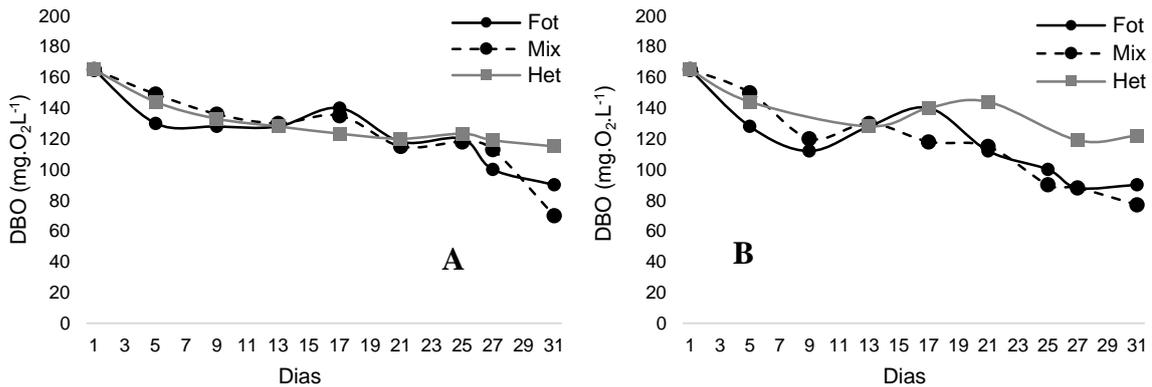
Na Fase I, as taxas de consumo de nutrientes nos cultivos autotrófico e fotoheterotrófico para ambas espécies foram semelhantes (Tabela 21), sendo esta taxa reduzida apenas no cultivo heterotrófico, dada a menor densidade celular no meio. No entanto, todos os tipos de metabolismo, foram capazes de exaurir $N-NH_4^+$ e $P-PO_4^{3-}$ do esgoto bruto.

Já na Fase II, o cultivo foi interrompido a partir da primeira fase de declínio, não sendo observado comportamentos de “recarga nutricional” e não havendo diferenças significativas nas taxas de consumo de $N-NH_4^+$ e $P-PO_4^{3-}$ em relação aos foto-períodos aplicados (14h:10h e 10h:14h).

5.2.5 Remoção de DBO dissolvida

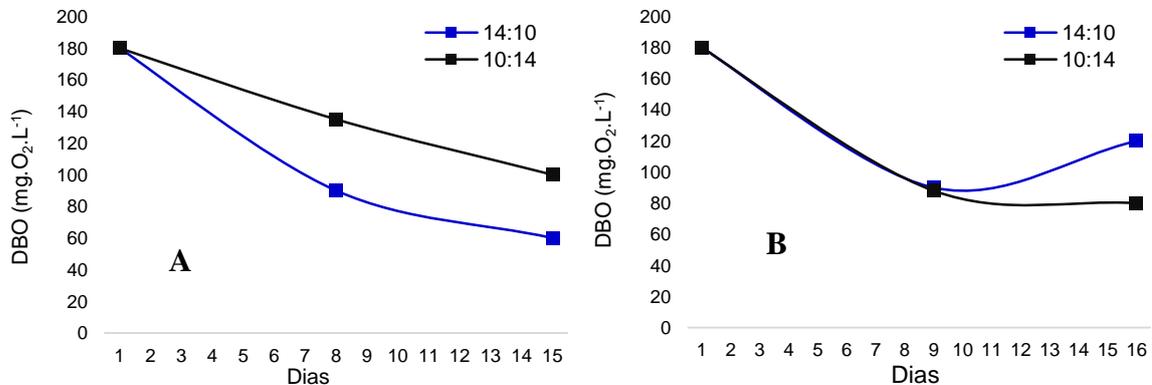
Nas Figuras 41 e 42 abaixo, tem-se os gráficos de decaimento de DBO dissolvida nos cultivos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico (Fase I) e nos cultivos fotoheterotróficos nas condições de iluminação 14h:10h e 10h:14h claro: escuro, para as espécies *D. subspicatus* e *C. vulgaris*.

Figura 41 - Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 42 - Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Em termos gerais, a remoção de DBO dissolvida no meio, nas duas Fases do experimento, mostrou-se semelhante ao observado em trabalhos que investigaram aspectos semelhantes (HASSAN et al., 2013; PEREZ-GARCIA et al 2011; CARPIO *et al.*, 2015). Na Fase I, a eficiência de remoção da DBO dissolvida esteve entre 26 e 45% e na Fase II entre 33 e 67%, sendo os cultivos fotoheterotróficos ligeiramente mais eficientes do que os demais cultivos.

Geralmente, a eficiência de remoção de DBO dissolvida por microalgas, pode variar entre 10 e 70%, a depender da fonte de carbono, do metabolismo aplicado ao cultivo, da espécie e da densidade celular alcançada (CARPIO *et al.*, 2015).

A remoção de DBO dissolvida observada nos cultivos sob metabolismo heterotrófico, pode ser associada a degradação bacteriana, visto que a composição de carbono em efluente doméstico não é suficientemente removida por microalgas atuantes em metabolismo heterotrófico. A composição do carbono orgânico nos efluentes domésticos, é basicamente constituída por carboidratos complexos, gorduras, proteínas, aminoácidos e ácidos voláteis, fontes de carbono não preferíveis por micro-organismos fotossintéticos atuando sob crescimento heterotrófico, devido à complexidade estrutural desses compostos (LIM *et al.*, 2010; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Durante a Fase II, onde se obteve eficiências de remoção ligeiramente maior que a Fase I, notou-se um declínio mais acentuado da DBO dissolvida. Certamente, as taxas de remoção de DBO (não calculadas neste trabalho) atuantes sob metabolismo fotoheterotrófico, apresentam-se mais elevadas do que quando comparadas as taxas de cultivos atuante sob metabolismo autotrófico.

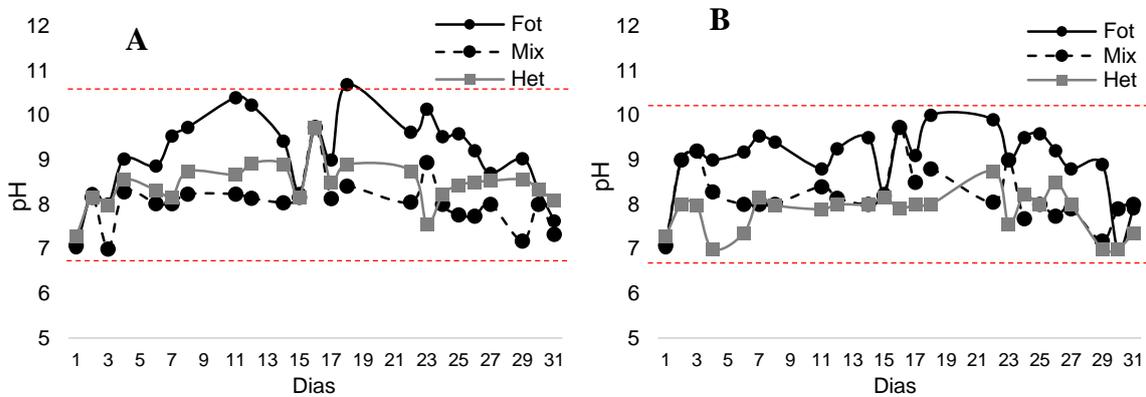
Perez-Garcia *et al.*, (2011), explicam que, durante a fase escura da fotossíntese, as células tendem a gerar energia por meio da fermentação de reservas de carbono acumuladas durante a fase clara da fotossíntese (sob forma de glicogênio), e assim, ao início da Fase clara, podem incrementar a fixação de carbono (em relação a um cultivo autotrófico) devido à exaustão das reservas intracelulares. Este preceito é bem aceito para fontes de carbono inorgânico, no entanto, é uma discussão também aplicada ao carbono orgânico dissolvido presente no meio. Dessa forma, justifica-se que cultivos fotoheterotróficos, tendem a incrementar a remoção de carbono (na forma de DBO dissolvida) do meio.

5.2.6 Aspectos fotossintéticos

Comportamento do pH

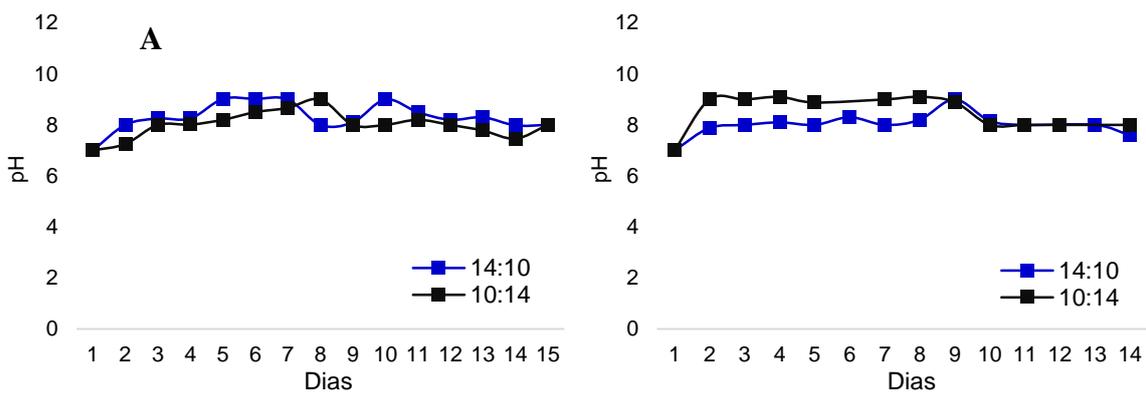
Nas Figuras 43 e 44 abaixo, tem-se o comportamento do pH nos cultivos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico (Fase I) e nos cultivos fotoheterotróficos nas condições de iluminação 14h:10h e 10h:14h claro: escuro, para as espécies *D. subspicatus* e *C. vulgaris*.

Figura 43 - Comportamento do pH nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 44 - Decaimento de DBO dissolvida nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Na Fase I, o pH se comportou de modo semelhante no cultivo das duas espécies, variando entre 7,0 e 11,0, com uma amplitude ligeiramente superior nos cultivos de *D. subspicatus*. Assim como esperado, altos valores de pH foram observados nos cultivos

autotróficos, principalmente nos períodos de pico de densidade celular em ambas as espécies (ver curvas de crescimento).

No entanto, os valores de pH nos cultivos fotoheterotróficos das Fases I e II, não se comportaram conforme esperado, apresentando valores inferiores ao que normalmente é descrito em literatura.

Roostaei *et al.*, (2018), explicam que valores de pH elevados são esperados durante a fase clara do cultivo fotoheterotrófico, devido a um mais intenso consumo de carbono durante esta fase. Os autores explicam que cultivos fotoheterotróficos, durante sua fase iluminada, tendem a ultrapassar valores de pH de um cultivo autotrófico, chegando em valores acima de 12 em muitos casos, e reestabelecendo uma condição próxima a neutralidade (8,0 – 8,5), durante a fase escura.

O comportamento do reduzido pH (aquém do descrito por Roostaei *et al.*, 2018) nos cultivos fotoheterotróficos das Fases I e II é justificado pelo fato de as aferições de pH no cultivo, terem sido realizadas apenas durante sua fase escura (que durante as Fases I e II foram aplicadas no período diurno). Mediante esta constatação, recomenda-se que o pH de cultivos fotoheterotróficos sejam aferidos nas fases clara e escura, fazendo possível uma avaliação mais precisa.

O indicativo de que o horário de aferição foi a causa para detecção de pH reduzidos, e não uma atividade fotossintética reduzida, está nas concentrações de clorofila α detectadas nos cultivos fotoheterotróficos das Fases I e II (Figuras 43 e 44). Valores elevados de clorofila α , indicam uma elevada atividade fotossintética (discutido na próxima sessão).

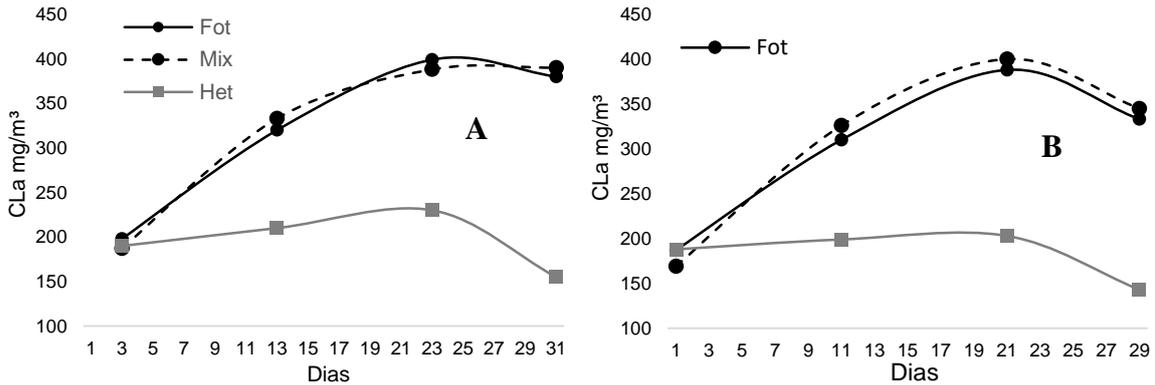
Valores elevados de pH elevado, são normalmente observados em períodos de intensa atividade fotossintética, quando as células microalgais, retiram do meio a acidez causada pelos ácidos carbônicos oriundos da atividade bacteriana sobre a degradação da matéria orgânica disponível no meio, levando ao acréscimo do pH (VALERO E MARA 2010).

Embora os valores de pH nos cultivos heterotróficos não terem alcançado valores comparados aos demais cultivos, notou-se em alguns dias de monitoramento, valores de pH próximos a 8,4, confirmando dessa forma, o consumo de uma parcela do produto da atividade bacteriana - carbono inorgânico, bem como de uma possível parcela de carbono orgânico durante a fase escura.

Clorofila α

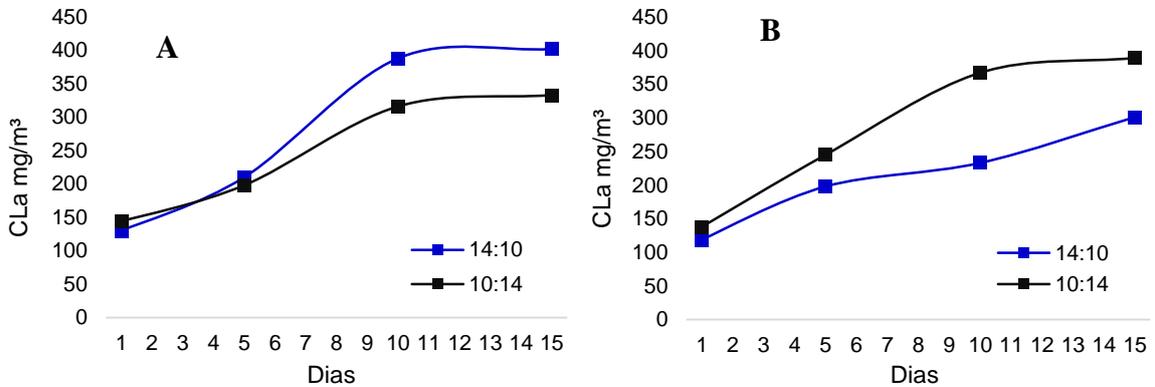
Nas Figuras 45 e 46 abaixo, tem-se o comportamento das concentrações de clorofila α nas Fases I e II para *D. subspicatus* e *C. vulgaris*.

Figura 45 - Comportamento do clorofila α nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismos autotrófico, fotoheterotrófico e heterotrófico, durante a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 46 - Comportamento do clorofila α nos cultivos de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) sob metabolismo fotoheterotrófico, nas condições 10h:14h e 14h:10h, durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Durante a Fase I, somente os cultivos mantidos em metabolismo heterotrófico produziram baixas concentrações de clorofila α , reafirmando a condição morfológica (formato irregular) e coloração visual observada (cor verde – turvo e amarronzado).

A ausência de luz em cultivos heterotróficos, levam a células a criar estratégia de sobrevivência, que, além de reduzir significativamente a produção de proteínas para seu crescimento, também reduz a produção de moléculas de clorofila α , pela falta de uma fonte de energia ativadora – luz (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011). Neste caso, onde não foram

adicionados fontes de C orgânico ao cultivo, as espécies estiveram à mercê do consumo do C inorgânico, fornecido pela atividade bacteriana, e dessa forma não obtiveram alto rendimento, afetando também a produção global de clorofila α .

Os cultivos autotrófico e heterotrófico, aparentemente não tiveram diferenças na produção de clorofila α , e embora tenham sido detectados baixos valores de pH nos cultivos fotoheterotróficos devido ao horário de aferição, a concentração de clorofila α acumulada, garante a eficiência fotossintética das espécies no cultivo.

As declínios na curva de concentração de clorofila, já ao final do cultivo, sugerem uma gradativa perda da eficiência fotossintética da população, indicando que a população alcançou sua fase de morte celular. Perez-Garcia *et al.*, (2011) explica a concentração de clorofila, além de estar intimamente ligada com a eficiência fotossintética, também pode prever o momento para a colheita do cultivo, evitando perdas de produtividade global.

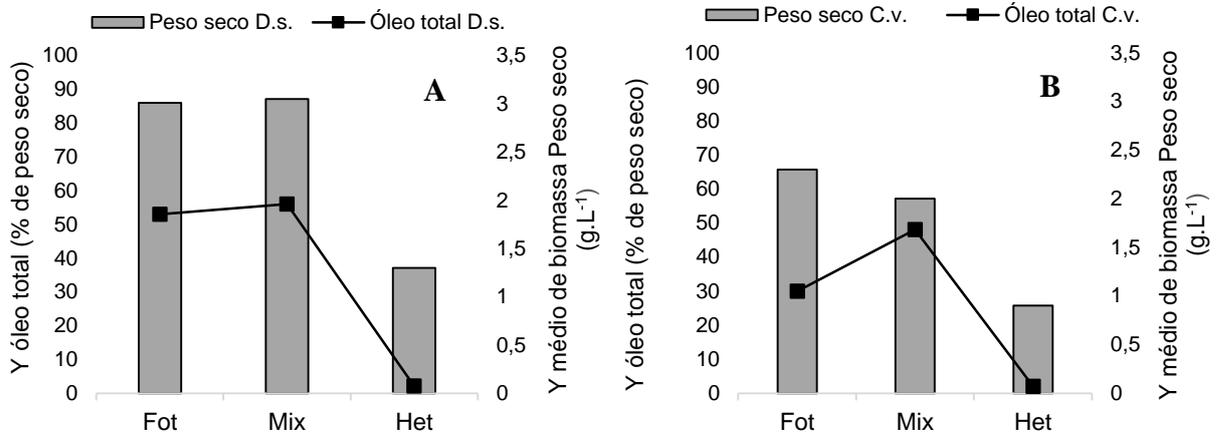
As concentrações de clorofila α acumulada pelas células durante a Fase II, sugerem que uma melhor eficiência em termos fotossintéticos, foi observada em *D. subspicatus* no cultivo com maior fase iluminada (14h:10h), e o oposto foi visto em *C. vulgaris*, que obteve maiores concentrações no cultivo de menor fase iluminada (10h:14h), mantendo-se dessa forma, um padrão de resposta já observado em outros parâmetros.

As concentrações de clorofila nas células, é um dos parâmetros mais importantes para se avaliar a atividade celular, servindo como uma resposta condicionante na eleição de critérios de utilização de uma espécie para diversos fins. No caso da aplicação de microalgas para utilização no tratamento de efluentes e produção de lipídeos, a resposta da eficiência fotossintética avaliada, nos permite fazer uma rápida análise econômica em favor da espécie mais eficiente mediante a aplicação de menor energia luminosa *C. vulgaris*, face à um menor aporte de recursos energéticos. No entanto, deve-se correlacionar essa eficiência com dados obtidos sobre o rendimento global de FAMES, o produto de interesse produzido pela biomassa, e dessa forma concluir finalmente qual a melhor condição aplicada.

5.2.7 Produção de biomassa, óleos totais e FAMES de interesse

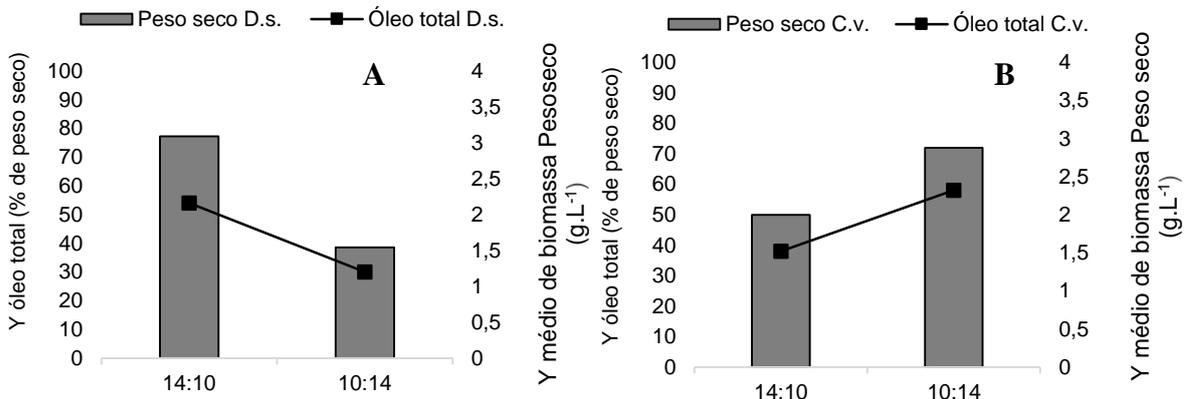
Nas Figuras 47 e 48 abaixo é possível observar o rendimento de óleos totais fazendo referência ao rendimento de biomassa total produzida por *D. subspicatus* e *C. vulgaris* nas Fases I e II:

Figura 47 - Percentagem de óleo total e rendimento de biomassa de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) na Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 48 - Percentagem de óleo total e rendimento de biomassa de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) na Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Durante a Fase I do experimento, conforme já comentado na Tabela 19, o desempenho de *D. subspicatus* foi superior ao de *C. vulgaris* em diversos aspectos, inclusive no rendimento de biomassa e de óleos totais.

Um rendimento de óleo, e produção de biomassa mais notáveis foram observados nos cultivos sob metabolismo autotrófico e fotoheterotrófico respectivamente, sendo este último ligeiramente maior (56% para *D. subspicatus*, e 48% para *C. vulgaris*) em rendimento de óleo.

Os cultivos heterotróficos, tiveram um rendimento de óleo extremamente baixo quando comparados aos demais metabolismos (2,1% para *D. subspicatus* e 2,0% *C. vulgaris*).

A baixa acumulação interna de lipídeos, pode estar associado a dois fatores interdependentes, tais como a (i) baixa eficiência na captura de carbono, que por sua vez provocou um (ii) baixo rendimento de biomassa. Franco *et al.*, (2013), explica que a assimilação de compostos de carbono pelas microalgas é essencial para o aumento da sua produtividade e acúmulo de lipídeos. Quando a fonte preferível de carbono não está disponível, embora a espécie crie estratégias de sobrevivência utilizando, em menores proporções, fontes alternativas, a produtividade e o desempenho do organismo na produção de biomoléculas, são afetados. Sendo assim, esses dois fatores atuando de modo interdependente, reflete na produção global de lipídeos acumulados.

Conforme já comentado, possivelmente a carência de C orgânico bioassimiláveis sob heterotrofia, mesmo diante estratégias de adaptação mediante as fontes disponíveis, as espécies tiveram taxas reduzidas de captura de carbono e também de estocagem lipídica.

O fato de *D. subspicatus* obter um maior rendimento de óleo em relação a *C. vulgaris*, pode estar relacionado à própria biologia da espécie. Segundo Becker (1994), espécies do gênero *Desmodesmus*, podem produzir 35 % de óleo, contra 25% naturalmente observado no gênero *Chlorella*. No entanto, esses rendimentos podem variar para mais ou para menos, a depender do suprimento de nutrientes (em concentração e proporção), dos sais presentes no meio, do fornecimento de luz, do tempo de cultivo etc.

O tempo de cultivo e o estresse nutricional, também foi um fator que favoreceu a biomassa no acúmulo de óleo. Costa *et al.*, (2006b) explicam que longos períodos de cultivo sob uma determinada condição de estresse, pode resultar numa biomassa rica em óleos. No entanto, vale ressaltar, que é importante um ponto de equilíbrio quando se trata do tempo de cultivo, que, por outro lado, pode forçar as células a consumir suas substâncias de reserva (lipídeos) como estratégia de sobrevivência.

Na Fase II, a tendência de favorecimento das espécies relacionado ao período iluminado, permaneceu. Sendo *D. subspicatus*, favorecido em produção de biomassa e rendimento de óleo, no período com maior tempo de fase clara (14h:10h), que teve um rendimento de óleo total = 54% enquanto *C. vulgaris*, foi favorecida nesses aspectos quando a fase escura foi maior (10h:14h), tendo rendimento de 58%.

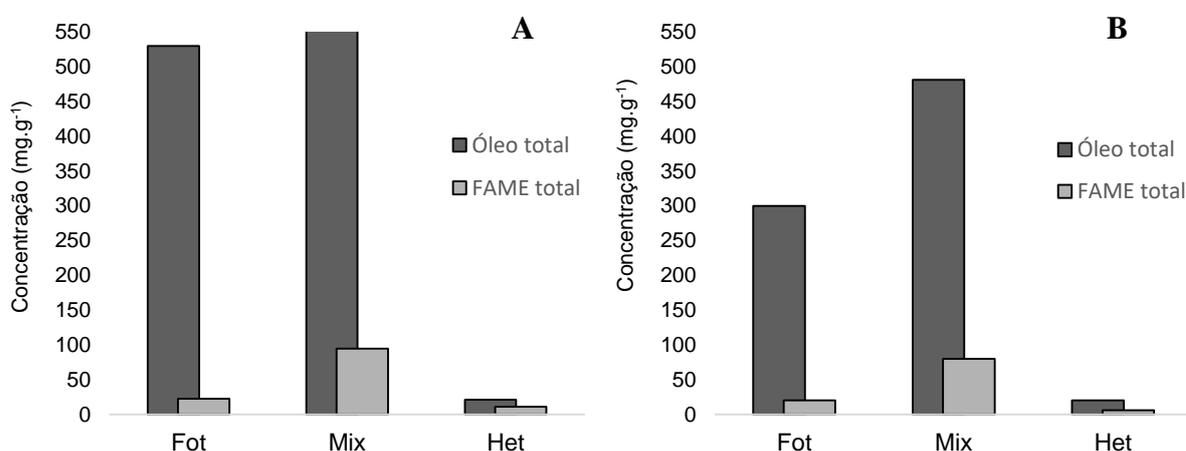
O comportamento exibido pelas espécies, reforçam a importância de estudos econômico prévios à sua aplicação para a produção de substâncias de interesse. Avaliando os

gráficos de rendimento de óleo total, fica claro a primeira vista que *D. subspicatus* seria a espécie mais indicada para aplicação dessa natureza. No entanto, economicamente, pode não ser favorável aplicar uma espécie que tem maior rendimento de óleo total em relação à outras, porém necessita de um maior período consumido recursos energéticos para que este rendimento seja alcançado. Avaliando a percentagem de rendimento das espécies, é possível entender que *D. subspicatus*, converteu 4% de óleo na biomassa a cada hora de luz fornecida, enquanto que *C. vulgaris* converteu 5,3% a cada hora luz aplicada. Um estudo baseado no valor dos kW/h seria necessário em comparação com o custo do produto que se pretende obter da biomassa, juntamente com custo do tratamento por m³ de esgoto, para então se avaliar o real custo/benefício para cada espécie com diferentes limites de saturação de luz.

Na Fase II, possivelmente, aumentando-se o tempo de cultivo, as espécies poderiam acumular ainda mais óleo, dada a acumulação vista na Fase I para cultivos fotoheterotróficos,

Nas Figuras abaixo, é possível observar o rendimento de óleos totais fazendo referência ao rendimento de FAMES totais.

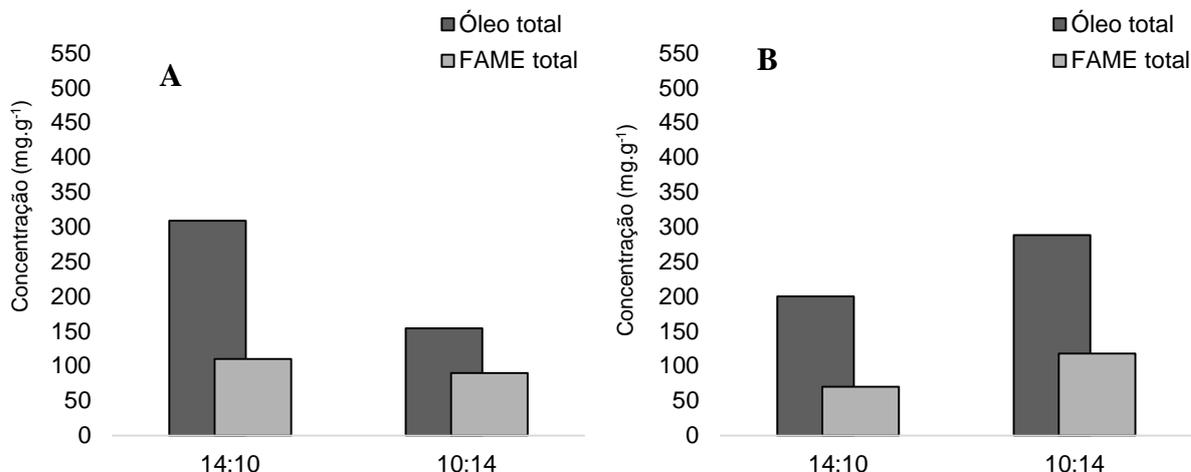
Figura 49 - Concentração de FAMES e óleo total de *D. subspicatus* (A) e *C. vulgaris* (B) na Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

A concentração total de FAMES, foi aparentemente proporcional à concentração de óleos totais observada, sendo o cultivo fotoheterotrófico mais uma vez superior neste aspecto.

Figura 50 - Concentração de FAMES e óleo total de *D. subspicatus* e *C. vulgaris* na Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Em se tratando da concentração de FAMES na Fase II, a mesma tendência foi observada para e em relação ao foto período, sendo *D. subspicatus*, mais produtiva em 14h:10h, e *C. vulgaris* em 10h:14h. *C. vulgaris* apresentou uma produção ligeiramente superior (7% a mais) do que *D. subspicatus*, sob o metabolismo de menor fase iluminada (10h:14h), indicando melhor produtividade utilizando menos recursos energéticos.

A distribuição de FAMES (não mostrada em gráficos), foi avaliada apenas na Fase II, seguiu o padrão comum para ambas as espécies, sendo C:14:0 a C:18:0 para *D. subspicatus* e C14:0 a C:18:0 para *C. vulgaris*. Vale salientar a aparição do C:14:0 no presente experimento, algo que não ocorreu nos experimentos 1 e 3. O C14:0 é citado na literatura como sendo um excelente óleo para a produção de biodiesel, com elevado número cetano, indicando uma rápida resposta entre o tempo de injeção do combustível à sua queima no motor (Franco *et al.*, 2013). Assim, deve-se considerar que a presença do C:14:0, esteve relacionada à variações no foto período das espécies, sendo o regime 14h:10h e 10h:14h, mais favoráveis para sua produção.

5.3 EXPERIMENTO 3: USO DA CIANOACTÉRIA *OSCILLATORIA TENNUIS* PARA TRATAMENTO DE EFLUENTE TEXTIL E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

Abaixo, segue a descrição detalhada de todos os resultados obtidos na execução do experimento 3, utilizando-se a cianobactéria *O. tenuis*:

5.3.1 Efluente utilizado no experimento 3

Os efluentes têxteis, embora apresentem cor elevada, foram escolhidos para compor este trabalho, pelo fato de conter concentrações consideráveis de nutrientes mesmo após seu tratamento. Além disso, a possibilidade de remoção de substâncias recalcitrantes e toxicidade por meio de microalgas e cianobactérias foram também consideradas na escolha deste efluente para estudo, visto que seu descarte no meio ambiente, mesmo depois de tratado por vias físico-químicas, eletroquímicas, ou mesmo biológicas, ainda é motivo de preocupação por parte dos pesquisadores, sendo necessária a investigação a partir de outros viés de pesquisa de modo a promover uma melhor tratabilidade deste efluente.

Tabela 22 - Conteúdo dos reatores nas Fases I e II.

	Reatores	Conteúdo	Fonte de C	Fotoperíodo
Fase I	R1	Efluente têxtil, cianobactéria imobilizada, luz e ar	Glicose	Contínuo
	R2	Efluente têxtil, cianobactéria suspensa luz e ar	Glicose	Contínuo
	R3	Efluente têxtil e ar	Glicose	Contínuo
	R4	Efluente têxtil luz e ar	Glicose	Contínuo
	R5	Efluente têxtil e luz	Glicose	Contínuo
Fase II	A	Efluente têxtil e cianobactéria suspensa	Amido	16h:8h
	G	Efluente têxtil e cianobactéria suspensa	Glicose	16h:8h
	E	Efluente têxtil e cianobactéria suspensa	Etanol	16h:8h
	BG-11	M. de cultura comercial e cianobactéria suspensa	BG-11	16h:8h

Fonte: A Autora (2019).

5.3.2 Características do efluente têxtil nas Fases I e II

As características físico-químicas do efluente utilizado nas duas etapas do experimento encontra-se dispostos na Tabela 23 abaixo:

Tabela 23 - Características do efluente têxtil utilizado no experimento.

Efluentes	DQO mg.O ₂ .L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg.L ⁻¹	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ⁻¹	S-SO ₄ mg.L ⁻¹	pH	Sal. (‰)	C:N	Azo (mM)
Fase I	1362±33	224±23	57,96 ± 2	17	6,0	1,5	6:1	0,032
Fase II	1550± 24	220± 21	55,3 ± 7	22	6,3	1,3	7:1	0,032

Fonte: A Autora (2019).

As características para a produção do efluente têxtil sintético utilizado nos experimentos das Fases I e II foi baseada na metodologia descrita nos trabalhos de Marcelino (2015), Amaral (2015) e Trindade (2013), que se basearam em características de efluentes reais de efluentes têxteis utilizando corantes *Direct Black 22*. Esses autores, que avaliaram em seus trabalhos a influência de aspectos tais como zonas de microaeração e aplicação de diferentes doadores de elétrons no tratamento biológico de efluente têxtil. Já a concentração de corante utilizada, foi baseada no trabalho de Dellamatrice *et al.*, (2017), que avaliou a degradação de corantes azuis e pretos por meio de diferentes espécies de cianobactérias.

A concentração de sulfetos, o pH e a salinidade do efluente, são aspectos naturalmente presentes nos efluentes têxteis devido a estrutura e composição química do corante azo. É válido salientar sobre as diferentes relações C:N utilizada nas duas fases do experimento. Este aspecto objetivou promover melhorias nas taxas de crescimento da espécie, levando a uma remoção mais eficiente de DQO do efluente. Este aspecto será discutido mais adiante. Na Tabela 24 abaixo, tem-se as eficiências de remoção de cada uma das fases do experimento.

Tabela 24 - Eficiências de remoção das Fases I e II.

Efluentes	DQO mg.O ² .L ⁻¹	N-NH ₄ ⁺ mg. L ⁻¹	P-PO ₄ ³⁻ mg. L ⁻¹	S-SO ₄ mg. L ⁻¹	Sal. (‰)	Cor mg. L ⁻¹
R1	41	67	31	95	13	95
R2	68	82	12	98	26	90
R3	11	10	5	90	20	54
R4	56	11	5	80	13	60
R5	38	6	33	85	13	56
A	60	99	99	63	83	63
G	84	99	99	77	83	66
E	98	99	99	64	79	72
Contr.	-	100	60	-	-	-

Fonte: A Autora (2019).

A partir de uma análise geral dos resultados, é possível observar que na Fase I do experimento, houve uma considerável remoção de cor, sulfetos uma remoção parcial de DQO no meio contendo cianobactérias. Na fase II, a remoção de nutrientes e DQO foi mais expressiva em relação aos outros parâmetros e em relação à Fase I. O comportamento desses aspectos serão discutidos nos tópicos adiante.

Na Tabela 25 abaixo, tem-se os aspectos de produtividade da biomassa de *Oscillatoria tennuis* utilizada nas Fases I e II deste experimento.

Tabela 25 - Produtividade de *Oscillatoria tenuis* utilizada nas Fases I e II deste experimento.

Efluentes	Biomassa total Peso g.L ⁻¹	Clorofila α mg.m ³⁻¹	Óleo total mg.g ⁻¹	AG total mg.g ⁻¹
R1	0,9	99	220	9,5
R2	1,0	50	393	18
BG-11	-	220	-	-
A	0,9	158	136	30
G	1,8	190	401	16
E	1,7	145	418	28
BG-11	2,1	300	134	111

Fonte: A Autora (2019).

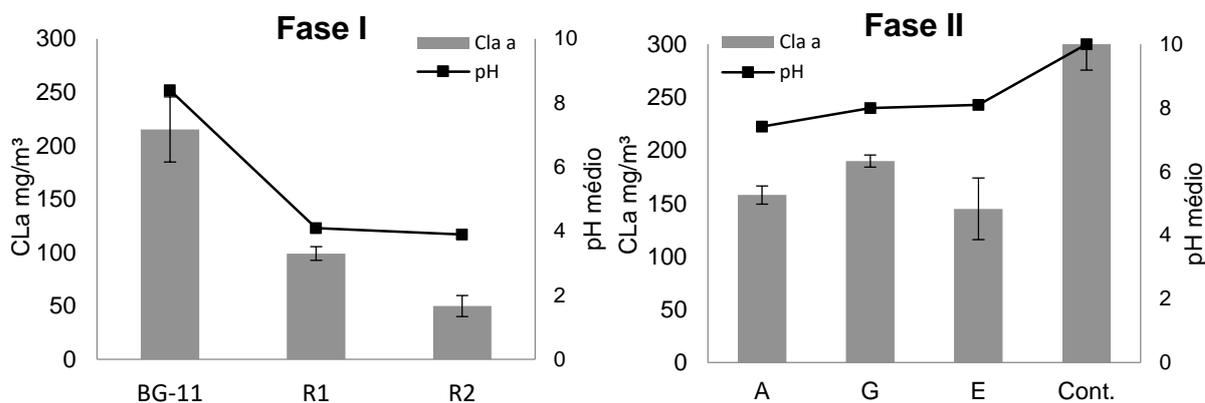
A partir de uma análise geral dos resultados, é possível observar uma maior produtividade em termos de biomassa e óleo total durante a Fase II do experimento, especialmente pelos reatores G e E. Estes reatores, juntamente com o A, foram os mais produtivos em termos de Clorofila α , quando comparados ao cultivo controle, contendo biomassa cultivada no meio BG-11. Quanto ao rendimento de ácidos graxos totais, notou-se uma baixa produção em todos os reatores de ambas as fases, chegando a ser até 25 vezes menor do que a concentração de óleo total gerado pela biomassa (reator G Fase II).

Vale ressaltar que o cultivo controle, obteve os melhores rendimentos em todos os parâmetros, com exceção da quantidade de óleo total produzida, levando a crer que o crescimento da cianobactéria em efluente têxtil, promove a inibição de tais parâmetros. Esses aspectos serão melhor discutidos nos tópicos a seguir.

5.3.3 Aspectos fotossintéticos: adaptação da cianobactéria no efluente têxtil

A partir dos resultados observados (Figura 51) abaixo, foi possível avaliar a aspectos sobre a eficiência fotossintética da cianobactéria *Oscilatória tenuis* em efluente têxtil durante as Fases I e II do experimento.

Figura 51 - Conteúdo de clorofila α nas células ao final das Fases I e II, comparado ao pH do meio.



Fonte: A Autora (2019).

A eficiência fotossintética dos organismos pode ser medida através de respostas metabólicas observadas na célula e no meio aquático em que crescem os organismos fotossintetizantes (COHEN, 1985). Neste estudo, para avaliar essa eficiência, considerou-se a relação mantida entre as médias de pH ao longo do experimento em comparação com a produtividade de pigmento fotossintético produzido, aferido, ao final de cada uma das fases.

Durante a Fase I (iluminação constante - glicose como fonte de C), o comportamento dos parâmetros indicaram uma reduzida eficiência fotossintética, com valores de pH médio em torno de 4,1 e 3,9 em R1 e R2 respectivamente, ao passo que a produção final de clorofila foi igualmente reduzida em relação ao controle cultivado em BG-11, sendo a concentração de clorofila α 220 mg.m³ e pH 8,1.

Já durante a Fase II (iluminação intermitente 16h:8h claro:escuro - amido, glicose e etanol como fonte de C), melhores condições de pH foram observadas, com produções visivelmente mais elevadas de clorofila α , indicando uma melhora na eficiência fotossintética mediante as condições aplicadas ao cultivo, possivelmente a condição de iluminação.

O comportamento dos parâmetros indicativos de eficiência fotossintética (pH e clorofila α), exibidos na Fases II, embora superiores em relação a Fase I, ainda refletem, em termos quantitativos, uma inibição da fotossíntese, possivelmente ocasionada pela presença de cor, fator que reduz a atenuação de luz na água, e especialmente à toxicidade causada pela presença de sulfato no efluente têxtil.

Em trabalho publicado por Cohen *et al.*, (1994), focado em estratégias adaptativas de cianobactérias na presença de sulfato, é relatado que a maioria das espécies, principalmente as filamentosas, são sensíveis às concentrações de compostos de enxofre, tais como sulfatos. No entanto, a depender do tempo de exposição e da concentração, as cianobactérias, podem criar estratégias adaptativas de sobrevivência em ambientes ricos nesse elemento, de modo que a assimilação de CO₂ e compostos de carbono orgânico – *heterofilia*, não sejam prejudicados, a ponto de declinar sua população.

Cohen *et al.*, (1994), explicam que uma exposição, mesmo que a curto prazo e à concentrações baixas desses compostos, pode causar uma parcial ou mesmo uma completa e irreversível interrupção da foto assimilação do CO₂ e de carbono orgânico. Já em casos de exposição prolongada, a cianobactéria tende a criar estratégias de adaptação, havendo uma inibição apenas parcial da fotossíntese oxigênica. A depender do tempo de exposição, a fotossíntese oxigênica pode ser completamente substituída pela fotossíntese anoxigênica (sulfeto-dependente). Esse fenômeno ocorre devido a uma resistência do fotossistema II a toxicidade deste elemento nas membranas celulares. Sendo assim, o grau de inibição ou adaptação, vai depender do grau de exposição à estes compostos Cohen *et al.*, (1994).

Cohen *et al.*, (1994), comentam que a resposta mais rápida de uma baixa eficiência fotossintética, é avaliada pelo nível de pH na água. Em estudo realizado com cianobactérias isoladas do meio ambiente, observaram que pH entre 6-8 podem indicar uma inibição parcial do fotossistema II, enquanto que uma faixa entre 3-5 indica a quase total inativação da fotossíntese dependente do fotossistema II (oxigênica).

Pode-se dizer que durante as Fases I e II do experimento, houve inibição parcial da fotossíntese, devido a toxicidade do sulfato no efluente (discutido no tópico a seguir). Esse cenário foi mais crítico durante a Fase I e, possivelmente, uma mais baixa eficiência de remoção de DQO foi resultado desta inibição.

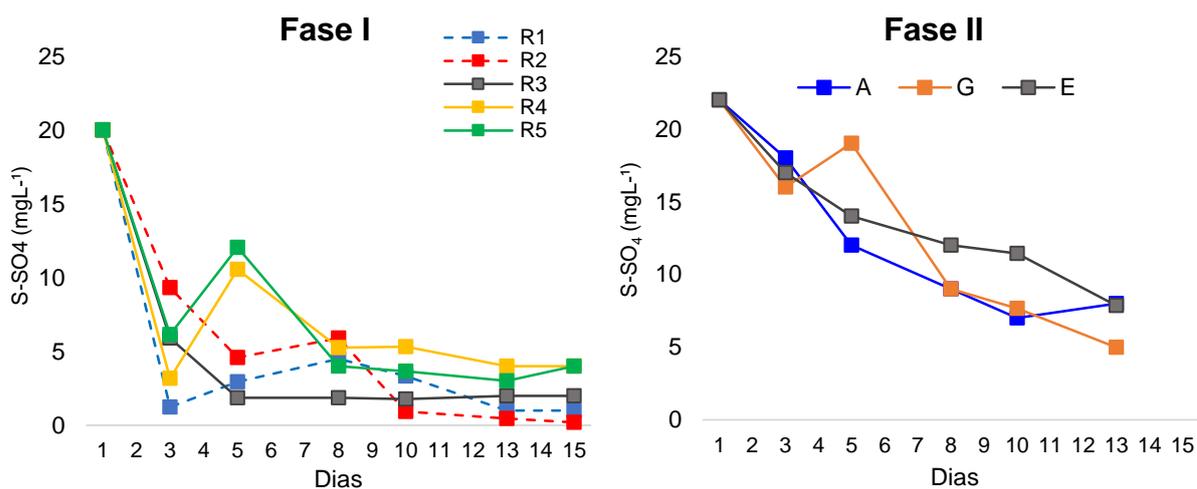
Possivelmente, mediante o curto tempo de exposição (14 dias) a uma concentração relativamente baixa de sulfato (20 mg.L⁻¹ Fase I e 22 mg.L⁻¹ na Fase II – e reduzindo ao longo do tempo), mudanças adaptativas capaz de promover uma total conversão na rota da fotossíntese não ocorreram. O mais provável é que tenha ocorrido apenas uma inibição parcial da fotossíntese, a partir de baixos valores de pH e clorofila a, especialmente na Fase I.

Na Fase II, baseado nos valores médios de pH e clorofila α na célula, essa inibição foi menos significativa, possivelmente pelo regime de iluminação aplicado (contendo fase escura), garantindo um melhor desempenho da espécie em termos de eficiência fotossintética, e conseqüentemente na remoção de nutrientes e remoção de DQO - visto que a fase escura tende a possibilitar a respiração de reservas do carbono assimilado, fazendo com que biomassa na fase clara capte uma quantidade superior de carbono do meio.

5.3.4 Sulfatos

Aspectos sobre remoção de sulfato do efluente têxtil durante as Fases I e II do experimento podem ser observados a partir da Figura 52 abaixo:

Figura 52 - Comportamento do sulfato no efluente durante as Fases I e II.



Fonte: A Autora (2019).

A remoção de sulfatos no meio, foi atribuída a fatores abióticos, visto que durante a fase I, sua redução foi observada em todos os reatores (com e sem cianobactérias) e numa mesma proporção. A redução de sulfato no meio, foi atribuída a uma adesão do composto nas paredes do reator, juntamente com o corante, como pode ser observado na Figura 52.

Os picos observados nas curvas de decaimento de sulfato durante as Fases I e II, podem estar relacionada a períodos em que houve o desprendimento de sulfato das paredes dos reatores, sendo assim detectado na análise.

Para que o sulfato pudesse se tornar-se insolúvel, possivelmente houve uma ligação a algum composto (por exemplo Ca^+) presente nos nutrientes adicionados ao reator para crescimento da cianobactéria.

Como não houve uma condição anaeróbia no reator, e nem a presença de bactérias (visto que todos os elementos adicionados ao reator foram produzidos com água autoclavada) não deve se considerar a hipótese de redução do sulfato a sulfeto, e deste a enxofre elementar.

Figura 53 - Reatores ao final do experimento exibindo crostas nas paredes e partículas sobrenadantes, podendo estar associadas a remoção abiótica de sulfato e cor.



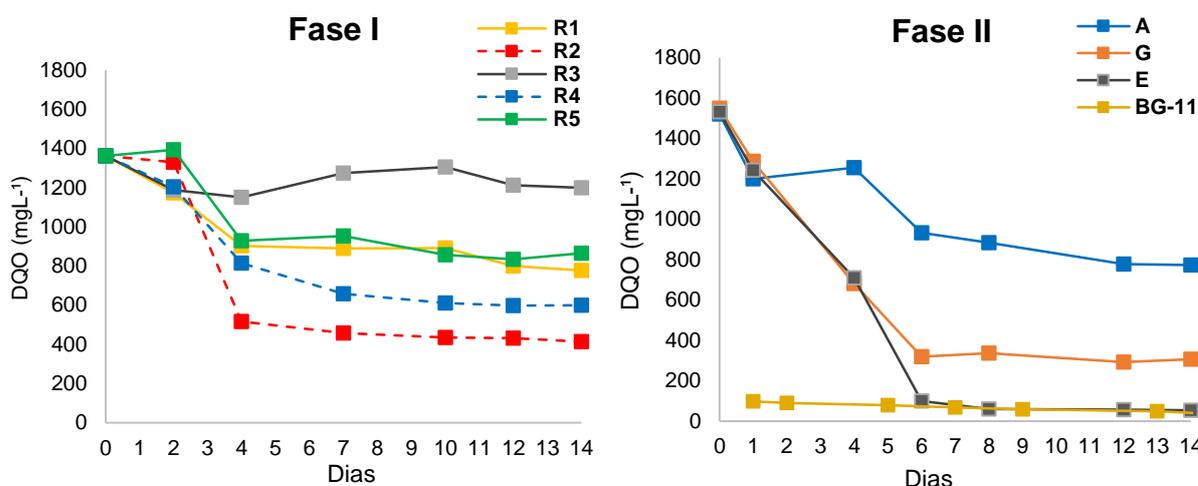
Fonte: A Autora (2019).

Na Fase I não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p=0,2$). Quando comparadas as Fases I e II, foram observadas diferenças significativas ($p=0,0092$) referentes aos grupos R1 vs. S ($p=0,026$), R1 vs. G ($p=0,031$) R2 vs. S ($p=0,046$), esR2 vs. E ($p=0,04$), R3 vs. S ($p=0,039$) e R3 vs. E ($p=0,047$)

5.3.5 REMOÇÃO DE DQO

A partir dos resultados observados (Figura 54) foi possível avaliar a redução de DQO nos cultivos contendo a cianobactéria *Oscillatoria tennuis*.

Figura 54 - Remoção de DQO por meio de *Oscillatoria tennuis* nas Fases I e II.



Fonte: A Autora (2019).

Observando os gráficos das Fases I e II, nota-se uma efetiva redução da DQO do meio dos reatores contendo cianobactéria suspensa (R2 – Fase I) e os reatores (E e G) contendo etanol e glicose (Fase II).

Conforme já comentado no tópico 5.3.3, a inibição da fotossíntese, possivelmente influenciou os níveis de remoção de DQO no meio. Subashchandrabose *et al* (2011), ressaltam que uma melhor remoção de compostos com estruturas aromáticas por microalgas ou cianobactérias, é possível quando uma maior eficiência fotossintética é observada no cultivo, estando esse aspecto, relacionado aos níveis de pH e clorofila a produzida pelo organismo.

Além disso, apesar da inibição fotossintética, aspectos de remoção foram melhorados na Fase II, quando comparados à Fase I, devido ao fato de uma aplicação de fase escura, conforme discutido no experimento 2 (PEREZ-GARCIA, 2011), juntamente a uma relação C:N, que possivelmente esteve mais próxima ao desejável para o crescimento desta espécie (7:1), e consequentemente a remoção de nutrientes no meio.

No entanto, deve-se também levar em consideração aspectos particulares nos reatores durante as duas fases.

Na Fase I, uma mais baixa eficiência do reator R1 (cianobactérias imobilizadas), em relação ao R2 (cianobactérias suspensas), possivelmente se deu pelo pouco contato entre meio e cianobactéria, dada sua imobilização em alginato. Já na Fase II, uma mais baixa eficiência do

reator A em relação aos demais, possivelmente se deu pela não preferência da cianobactéria a esta fonte de carbono (amido).

A remoção de DQO por meio de fatores abióticos, avaliadas durante a Fase I, deve ser levada em consideração, visto que os reatores R3 (contendo efluente e ar), R4 (contendo efluente luz e ar) e o R5 (contendo efluente e luz) ainda foram capazes de remover cerca de 11, 56 e 38% da DQO dissolvida respectivamente, devendo-se ser notada a participação da iluminação e do borbulhamento de ar na remoção de DQO por processos foto oxidativos.

Neste estudo, deve-se considerar que a remoção de DQO obtida nas duas fases foram elevadas quando comparadas com outros trabalhos utilizando micro-organismos fotossintetizantes para o tratamento do efluente contendo corantes.

El-Kassas e Mohamed (2014), utilizando *C. vulgaris* no tratamento de efluente têxtil, observou uma remoção de até 69% da DQO dissolvida no meio, porém utilizando efluente têxtil com 17% de diluição (DQO 51,2 mg.O₂.L⁻¹).

A literatura envolvendo cianobactérias no tratamento de efluente têxtil, ainda é escassa, e ainda muito focada na remoção de cor do efluente, sendo este aspecto ainda de difícil compreensão.

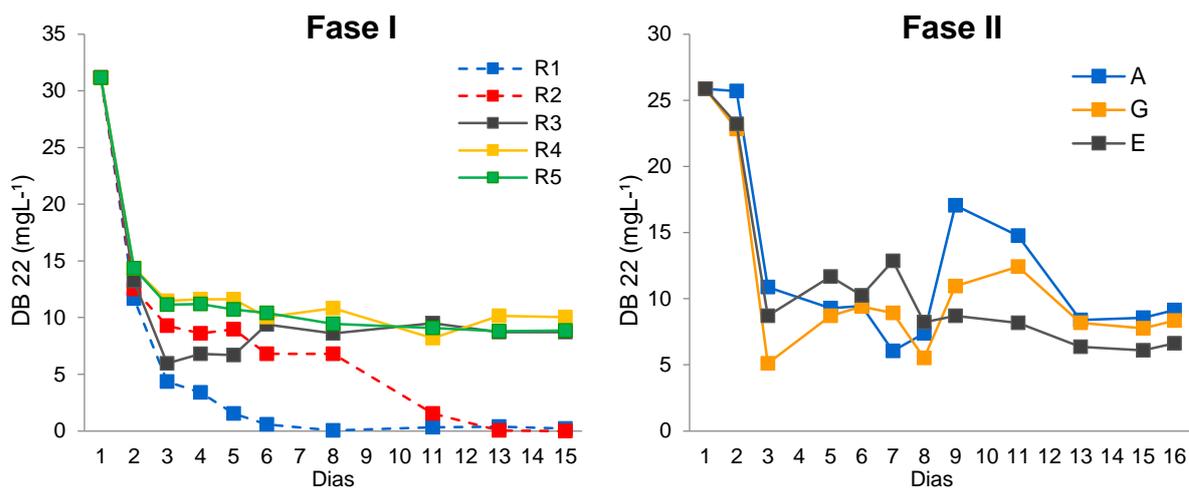
Além disso a remoção de DQO por meio de organismos fotossintetizantes pode estar relacionada não apenas ao consumo dos contaminantes do meio, mas também pela transformação dos compostos. Subashchandrabose *et al* (2011), relatam que cianobactérias, especialmente aquelas do gênero *Anabaena* e *Nostoc*, são capazes de converter por exemplo compostos DDT em DDD, além de alguns tipos de pesticidas em outros compostos que contribuem para uma menor carga no efluente. Além disso, a remoção do corante no efluente pode ser considerada como um fator contribuinte na remoção de DQO do meio. Aspecto discutido a seguir.

Na Fase I não foram avaliadas diferenças significativas na remoção de DQO entre os tratamentos ($p= 0,055$). Quando avaliados todos os tratamentos na remoção de DQO, diferenças foram verificadas entre R1 vs. BG-11 ($p=0,0167$), R3 vs. BG-11 ($p=0,0002$), R5 vs. BG-11 ($p=0,0037$) A vs. BG-11 ($p=0,0096$). Relatório em ANEXO.

5.3.6 Remoção de cor

A partir dos resultados observados (Figura 55) abaixo, foi possível avaliar a degradação do corante *DB 22* nos cultivos contendo a cianobactéria *Oscilatória tennuis*.

Figura 55 - Degradação do corante DB 22 nos cultivos contendo a cianobactéria *Oscilatória tennuis*.



Fonte: A Autora (2019).

Observando os gráficos das Fases I e II, nota-se uma rápida e efetiva redução do corante em todos os reatores contendo o efluente têxtil (com exceção do reator controle usado na Fase II) Nos dois primeiros dias de experimento, tanto na Fase I, como na Fase II, a drástica redução de cor no efluente, deveu-se principalmente à aderência do corante às paredes e mangueiras internas dos reatores, assim como também foi observado no recipiente de preparo do efluente têxtil sintético, poucas horas após seu preparo.

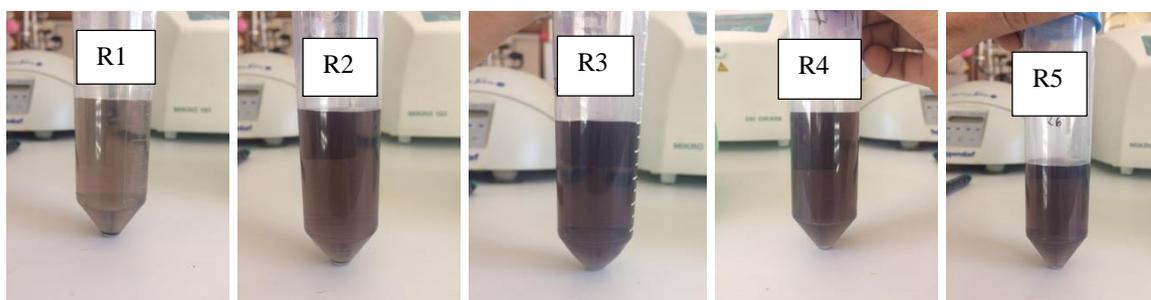
O indicativo de remoção de corante devido à sua aderência nas paredes do recipiente de preparo é também observada pela concentração inicial indicada no dia 0, onde nota-se perdas significativas (tendo em vista que a concentração de preparo foi de 35 mg.L^{-1}). Sendo assim, considerou-se que nos primeiros dias, a remoção de corante do efluente foi de natureza física, podendo não ter havido neste período, participação biológica efetiva. Esta conclusão é válida, pelo fato de haver uma repetição deste fenômeno nas duas fases do experimento e em todos os reatores contendo efluente têxtil, independente do seu contato com micro-organismos.

Marcelino (2015), comenta um fato semelhante em seu estudo, onde observou um considerável decaimento da concentração de *DB 22*, logo nas primeiras horas após o *start-up*

dos sistemas biológicos de tratamento, sendo este fato, também associado à aderência do corante às paredes do reservatório do efluente bombeado ao sistema.

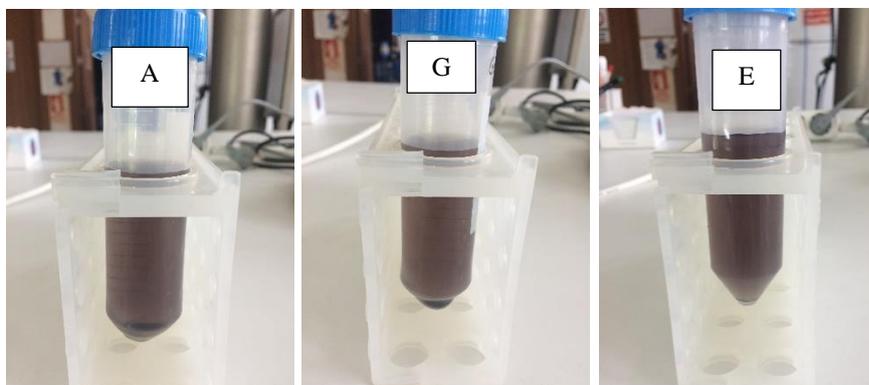
Dessa forma, considera-se a participação biológica ou de qualquer outra natureza, somente após o segundo dia de experimento (nas duas fases operacionais) pelo fato de também ter havido tal remoção nos reatores que não continham microalgas (suspensas ou imobilizadas) nas primeiras horas, e na mesma proporção. Nas Figura 56 e 57 abaixo, tem-se o aspecto dos efluente logo após a remoção física dos corantes.

Figura 56 - Coloração de efluentes nos diferentes reatores no 2º dia de experimento durante a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 57 - Coloração de efluentes nos diferentes reatores no 2º dia de experimento durante a Fase II.



Fonte: A Autora (2019).

Durante a Fase I, (onde se utilizou glicose como fonte de carbono e iluminação contínua) notou-se que, logo após o segundo dia de experimento, onde considerou-se o início da participação biológica na remoção do corante, há uma estabilização da redução do corante, nos reatores onde não houve inoculação de cianobactérias, havendo continuidade de redução apenas nos reatores R1 (cianobactérias imobilizadas) e R2 (cianobactérias suspensas), chegando à níveis de pouca ou nenhuma detecção do corante.

É válido salientar que, embora a eficiência de remoção do corante no reator R1, tenha sido elevada, essa remoção pode estar associada a uma continuidade de aderência do corante ao polímero à base de alginato, utilizado na imobilização das cepas inoculadas ao reator. Figura 58 abaixo:

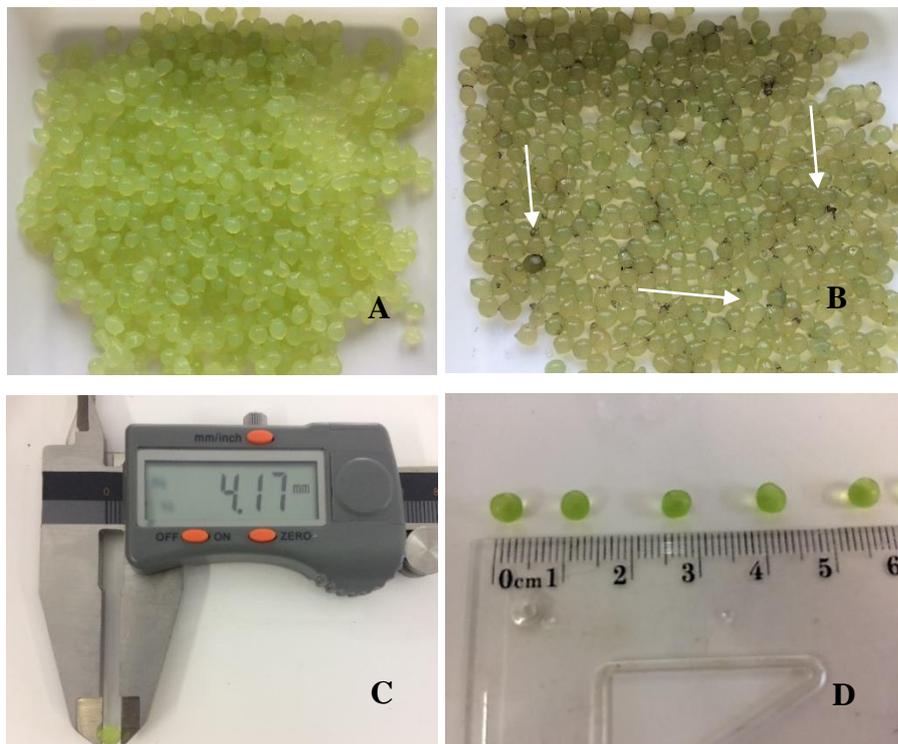
Figura 58 - Remoção do corante no reator R1, podendo estar associado a ligação com alginato. 7º dia de cultivo.



Fonte: A Autora (2019).

Constatou-se a presença de pequenas partículas de alginato que foram desprendidas dos *beads* no fundo reator. Essas partículas continham pequenos grumos de corante associados, levando a crer que a presença de alginato no reator, foi um fator que contribuiu na redução de cor do efluente do reator R1. Figura 59.

Figura 59 - *Beads* de cianobactérias antes (A) e depois (B) do experimento. Tamanho dos beads utilizados (C e D) Fase I. Detalhe para os grumos de corante.



Fonte: A Autora (2019).

Já no reator R2, foi observada a incorporação do corante aos filamentos de células de *Oscillatoria tenuis*, à medida que a biomassa crescia e formavam filamentos ligados às mangueiras e estruturas internas do reator. A descoloração do efluente contendo cianobactéria suspensa, pode ser associado a uma efetiva adsorção do corante à sua parede celular. Por meio do metabolismo, algumas espécies são capazes de promover essa adsorção, a depender de aspectos da biologia da espécie, tais como taxas de crescimento, e estrutura celular. Estruturas filamentosas completamente negras (Figura 58) foram observados à partir do terceiro dia de cultivo, quando os primeiros filamentos celulares começaram a se formar.

Delamatrice *et al.*, (2017) comentam em seu estudo, que a cianobactéria filamentosa do gênero *Phormidium*, foi capaz de reduzir 91% corante *índigo blue* presente no efluente têxtil, mas foi incapaz de descolorir o efluente contendo o corante *sulphur black* e o RBBD (Remazol Brilliant Blue). Já espécies do gênero *Anabaena*, foram capazes de promover descoloração parcial de efluente têxtil contendo corantes negros. Os autores utilizaram reatores aerados, sob regime de iluminação contínua e utilizando como fonte de carbono o amido tipicamente encontrado no efluente.

Dessa forma, pode-se dizer que a eficiência da descoloração por meio de cianobactérias em efluentes têxteis contendo corantes, vai depender da estrutura do corante e da biologia de cada espécie aplicada para este fim. Logicamente as condições operacionais do reator, é sem dúvida, outro fator limitante e igualmente importante.

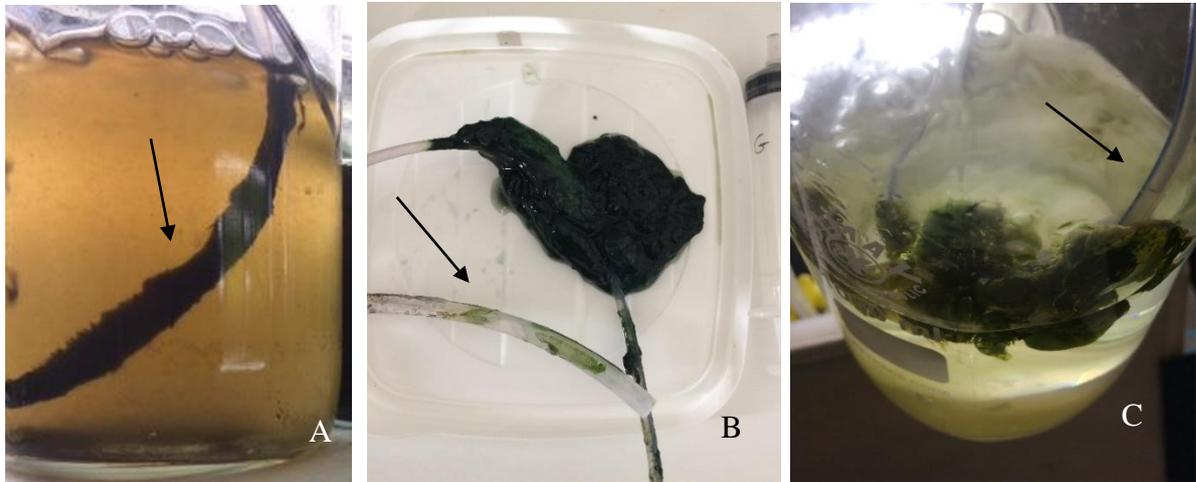
A capacidade de descontaminação de ambientes por meio de cianobactérias já é bem conhecida. Algumas pesquisas tem comprovado a eficiência do uso de cianobactérias na degradação de contaminantes persistentes. Cáceres *et al.*, (2008a), comentam que a estrutura de diversos poluentes, podem sofrer transformações a partir do uso de cianobactérias para seu tratamento. Os autores observaram transformações na estrutura química de diversos compostos de difícil degradação, tais como pesticidas organofosforados. Posteriormente, tanto os pesticidas como seus metabólitos, foram encontrados bioacumulados nas paredes celulares das espécies de cianobactérias, comprovando a degradação e acumulação desses compostos pelos organismos Cáceres *et al.*, (2008b).

Na Fase 2 do experimento (onde foram utilizados amido, glicose e etanol como fonte de carbono e iluminação 16h:8h claro: escuro), logo após o período de redução física do corante, notou-se certa instabilidade da concentração do mesmo no efluente, o que leva a crer que, possivelmente pelas condições aplicadas ao cultivo, houve níveis de adsorção e de-sorção do corante pelas células, sendo este fato, possivelmente associado ao regime de iluminação utilizado, desfavorecendo a remoção de cor.

Um fato que deve ser levado em consideração, é que as células de *Oscillatoria tennuis* nos reatores da Fase II, não formaram os típicos filamentos aderidos às partes físicas de nenhum dos reatores, assim como ocorreu no reator R2 na Fase I (Figura 57).

Possivelmente o regime de iluminação aplicado nos reatores da Fase II, pode ter sido a causa para a não formação de filamentos longos pelas células, já que a cepa mãe utilizada nas duas fases provinham da mesma linhagem de células. Na Fase II as células se distribuíram no reator, na forma de grandes grumos arredondados e flotantes no efluente. Este comportamento é visto em cianobactérias vivendo ambientes aquáticos naturais que sofrem algum regime de variação luminosa por meio de sua profundidade. Cáceres (2008a), explica que algumas espécies, incluindo o gênero *Oscillatoria*, adaptam estruturas como vacúolos flotantes, de modo a alcançar a superfície e assim obter uma maior exposição à luz. Essa conformação da biomassa, pode não ter favorecido a adsorção de cor em maiores quantidades.

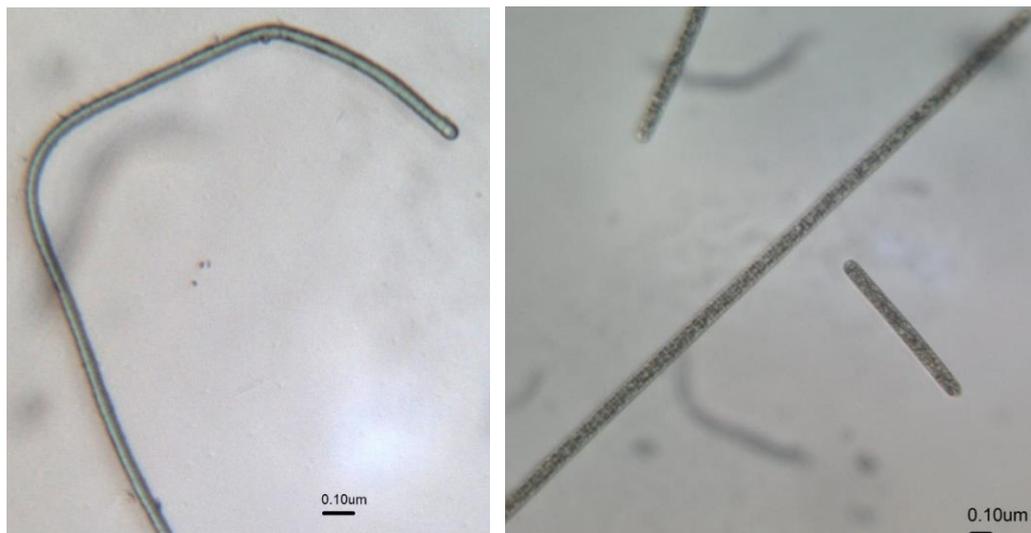
Figura 60 - Filamentos negros de *O. tenuis* aderidos à mangueira de aeração em reator R2, no 10º dia de cultivo durante a Fase I do experimento (A). Grumos de *O. tenuis* observados em todos os reatores da Fase II. (B) A mesma estrutura também foi observada no reator controle da Fase II (C). 14º dia de cultivo.



Fonte: A Autora (2019).

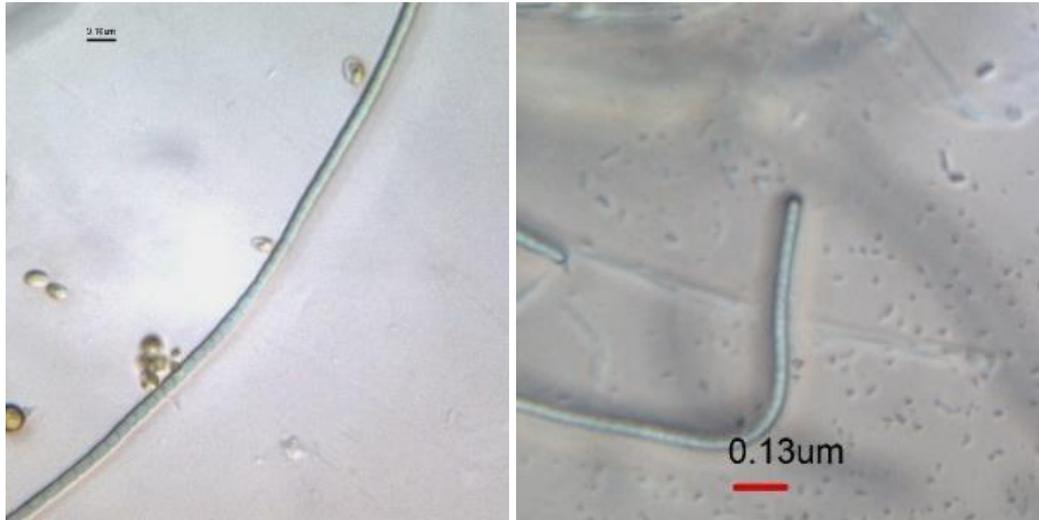
Também notou-se que na Fase II, a biomassa esteve menos corada do que na Fase I, indicando uma menor adsorção da cor. Essa condição foi confirmada em análise microscópica dos filamentos. Figuras 61 e 62.

Figura 61 - Aspecto do filamento de *O. tenuis* em suspensão (Reator R2) após a Fase I.



Fonte: A Autora (2019).

Figura 62 - Aspecto do filamento de *O. tenuis* em suspensão (Reator R2) após a Fase II.



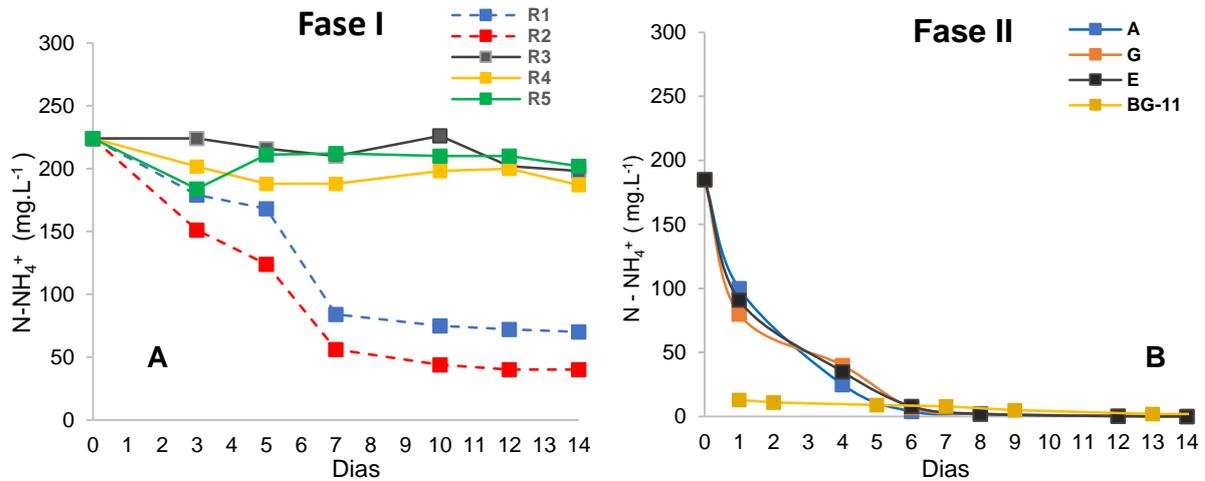
Fonte: A Autora (2019).

Estatisticamente, houveram diferenças significativas na remoção de cor Durante a Fase I ($p = 0,0074$). Essas diferenças foram atribuídas aos grupos R1 vs. R2 ($p=0,0176$) e R1 vs. R5 ($p=0,044$). Diferenças também foram significativas quando comparadas as Fases I e II ($p= 0,0114$), estando essas diferenças novamente associadas aos grupos R1 vs. R2 ($p= 0,020$) e R1 vs. R5 ($p=0,034$). Avaliando os tratamentos da Fase II isoladamente, não foram detectadas diferenças entre os tratamentos para a remoção de cor ($p =0,12$). Relatório em ANEXO.

5.3.7 REMOÇÃO DE NUTRIENTES

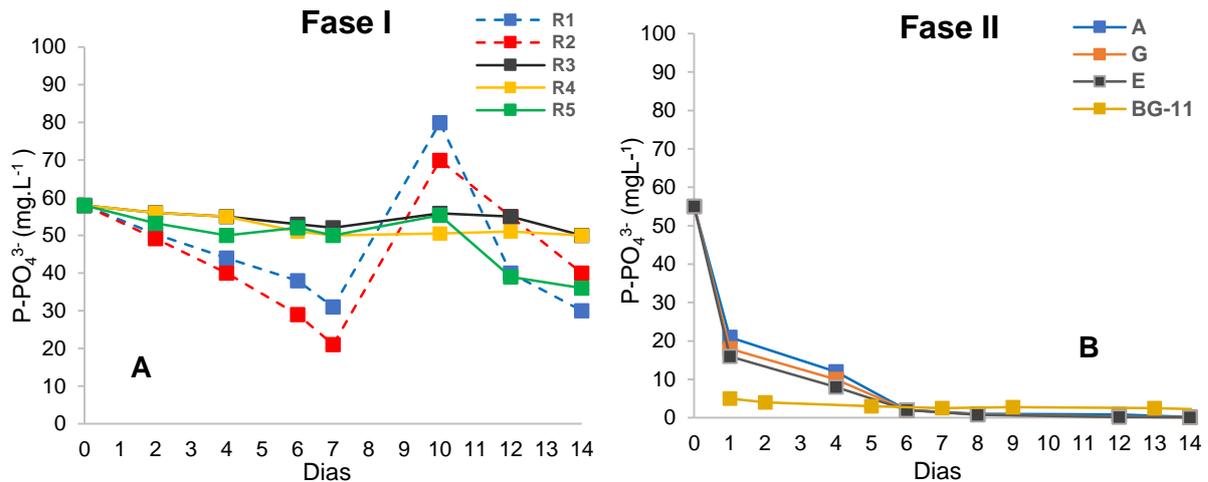
As Figuras abaixo, revelam o comportamento da remoção de $N-NH_4^+$ e $P-PO_4^3$, do efluente têxtil sintético nas duas fases experimentais.

Figura 63 - Concentrações de $N-NH_4^+$ nos reatores durante as Fases I (A) e II (B).



Fonte: A Autora (2019).

Figura 64 - Concentrações de $P-PO_4^{3-}$ nos reatores durante as Fases I (A) e II (B). (2019).



Fonte: A Autora.

Durante a Fase I, a redução de amônia no meio, foi apenas observada nos reatores contendo cianobactérias, caracterizando, dessa forma, o seu consumo pelos micro-organismos. Eficiências de 67 e 82% nos reatores R1 (cianobactérias imobilizadas) e R2 (cianobactérias suspensas), respectivamente, foram observadas. A maior taxa de consumo em R2, está relacionada com a um melhor contato célula-efluente, favorecendo a captura deste íon pela biomassa.

Vale salientar, que os baixos valores de pH no meio durante a Fase I, refutam a hipótese de conversão da amônia à sua forma livre: NH_3 e a uma possível remoção do meio via

volatilização. Além disso, a estrutura fechada dos reatores, não permitem a saída de gases do sistema.

O consumo de amônia na Fase II, alcançou 99% de eficiência em todos os reatores já no 8º dia de cultivo. O pH na Fase II, embora mais elevado que na Fase I, não pôde alcançar valores superiores a 9,2 relatado por Valero e Mara (2010), como o que torna possível a conversão da amônia ionizada (NH_4^+) à sua forma livre. Assim, também assume-se que todo conteúdo amoniacal, foi removido exclusivamente pelo metabolismo de *O. tenuis*.

Na Fase I, o consumo de amônia no meio foi prejudicado, possivelmente por aspectos inibitórios da fotossíntese, conforme já comentado anteriormente. A inibição da fotossíntese, além de reduziro crescimento da espécie, consequentemente pode reduzir as taxas de captura de C, N e P do meio, a depender do tempo e grau de exposição a compostos tóxicos (Cromar e Fallowfield (2003). Durante a Fase II, devido uma inibição pouco significativa e ao foto período que favoreceu melhores capturas, mais altas eficiências de remoção de nutrientes foram observadas.

Em se tratando da remoção de PO_4^{3-} , durante a Fase I do experimento, um comportamento peculiar foi observado nos reatores contendo biomassa, havendo picos de concentração no meio no 10º dia de monitoramento. Possivelmente, esse comportamento se deu, devido a uma expulsão do fósforo intracelular, numa situação de estresse sofrida pela biomassa neste dado momento. Supõe-se que uma queda de energia com duração de 12h (que atingiu aproximadamente 11h de fase clara), tenha levado a biomassa a um possível estresse, provocando a liberação de compostos fosfatados para o meio.

Vale ressaltar que fase clara do cultivo, começava as 8h da manhã, e terminava as 00h, iniciando a fase escura. A queda de energia, cessou o fornecimento de luz e mistura do cultivo, prolongando a fase escura por 23h. Outra hipótese é uma degradação dos compostos da amostra, que foi lida apenas após 24h (mediante acidificação para sua conservação). Descarta-se a hipótese do pH ter sido um fator de estresse a biomassa, que, embora se tenha observado valores muito baixos (em torno de 3,5 e 4), esse padrão foi mantido desde o dia 1 de experimento, até o dia 14, não havendo situações de quedas bruscas.

Na Fase II, a remoção de fósforo foi constante e satisfatória, estando o cultivo escasso desse nutriente já no 6º dia de cultivo.

Aspectos abióticos, por sí só, também não foram representativos na remoção PO_4^{3-} do meio, visto que os reatores onde não haviam cianobactérias, tiveram remoções praticamente nulas deste nutriente.

Condições de baixas eficiências na captura de nutrientes, podem-se dever a aspectos intimamente ligados a densidade do cultivo no meio, bem como a falhas nos sistemas de captura de nutrientes.

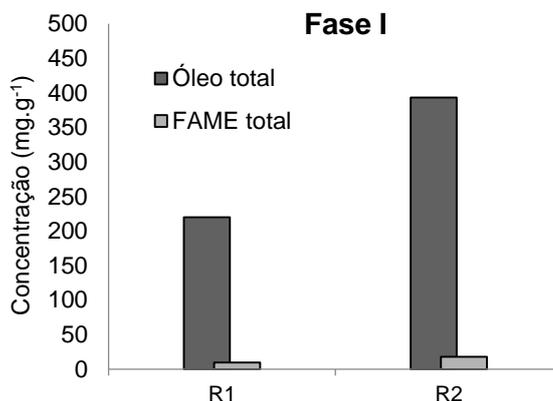
É relatado na literatura que a relação C:N, pode influenciar na captura global de nutrientes do meio, visto que uma maior taxa de crescimento pode ser alcançada, aumentando sua densidade no meio e em contrapartida a taxa de captura de nutrientes. Em efluentes onde a relação C:N inicial encontra-se mais próxima ao desejável para o crescimento máximo da espécie, um melhor desempenho em termos tanto de remoção de carbono, como de remoção de nutrientes pode ser observado – assim como comentado no experimento 1 deste trabalho (Wu *et al.*, 2011). Esse fato, leva a crer que a relação C:N no início do cultivo, é um dos fatores limitantes para desenvolvimento de estratégias de desempenho máximo por células fotossintetizantes, mesmo numa condição em que há no meio aspectos inibitórios, como substâncias tóxicas – sulfato, havendo medidas de auto regulação que garantam sua sobrevivência e alto desempenho no meio.

Em termos de produção de biomassa, constatou-se de fato, que, a biomassa cultivada durante a Fase II, obteve um rendimento final superior ao obtido na Fase I (Tabela 25).

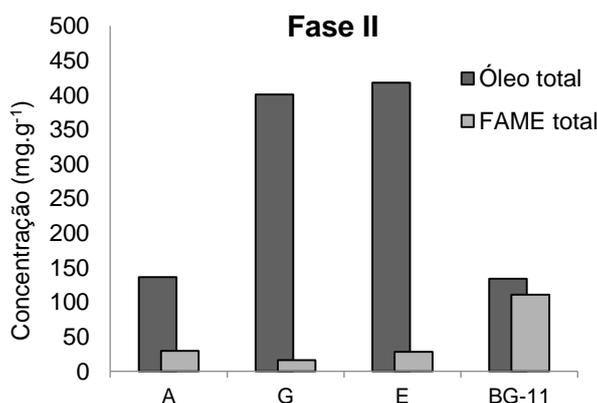
Sendo assim, conclui-se que a aplicação de uma fase escura juntamente com relação C:N mais próximo ao desejável pela espécie, são dois pontos chaves na melhoria do tratamento do efluente, em termos de remoção de nutrientes, assim como na remoção de DQO.

5.3.8 Produção de biomassa, óleo e FAMES de interesse

As Figuras 65 e 66 abaixo, apresentam aspectos referentes à produção de óleo total e ácidos graxos pela cianobactéria *Oscillatoria tenuis*, nas fases I e II:

Figura 65 - Conteúdo de óleo total e FAME's de interesse gerado pela biomassa durante a Fase I.

Fonte: A Autora (2019).

Figura 66 - Conteúdo de óleo total e FAME's de interesse gerado pela biomassa durante a Fase II.

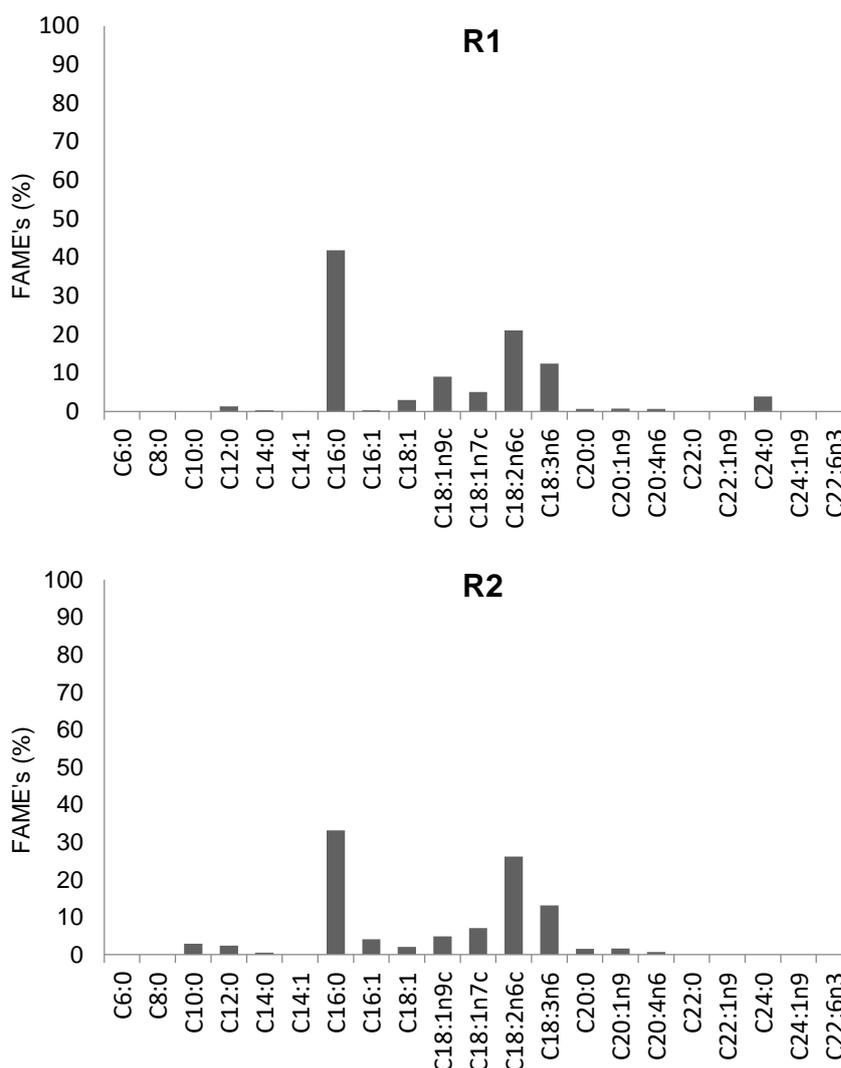
Fonte: A Autora (2019).

A produção de óleo total foi considerável para a espécie em questão, que produz uma média de 17 a 20 % de óleo total segundo Becker (1994). A produção foi mais expressiva em R1 e R2 foi de 22 e 39% (Fase I) e em G e E: 40 e 41 %. Nota-se que a fonte de carbono à base de amido e o meio de cultura comercial, BG-11, não favoreceram a produção de óleos totais, perfazendo totais (14 e 13% respectivamente).

A formação de ácidos graxos durante as Fases I e II, foi bastante tímida, não superando concentrações acima 19 mg.g⁻¹. No entanto, uma maior concentração de FAMES foi obtida pela biomassa cultivada no reator controle, contendo BG-11, o que leva a crer que o efluente têxtil pareceu inibidor à produção de ácidos graxos no interior da célula. A baixa produção de FAMES, não foi associada à eficiência fotossintética diretamente, visto que o nível de produção de AG's foi semelhante, mesmo quando a eficiência fotossintética foi superior (Fase II).

Não foi observada deficiência de amônia no meio, o que poderia ser uma razão para a o não rendimento de na produção de FAMES pela biomassa. No entanto, essa hipótese deve ser também descartada, pelo fato de ter havido uma produção elevada de óleo total, sendo apenas a produção de FAMES afetada. Na Figura 66 abaixo, tem-se a quantificação de cada ácido graxo gerado nos diferentes cultivos da Fase I.

Figura 67 - Percentagem de FAMES produzidos pela biomassa imobilizada (R1) e suspensa (R2) cultivada em fluente têxtil utilizando glicose como fonte de carbono, durante a Fase I.



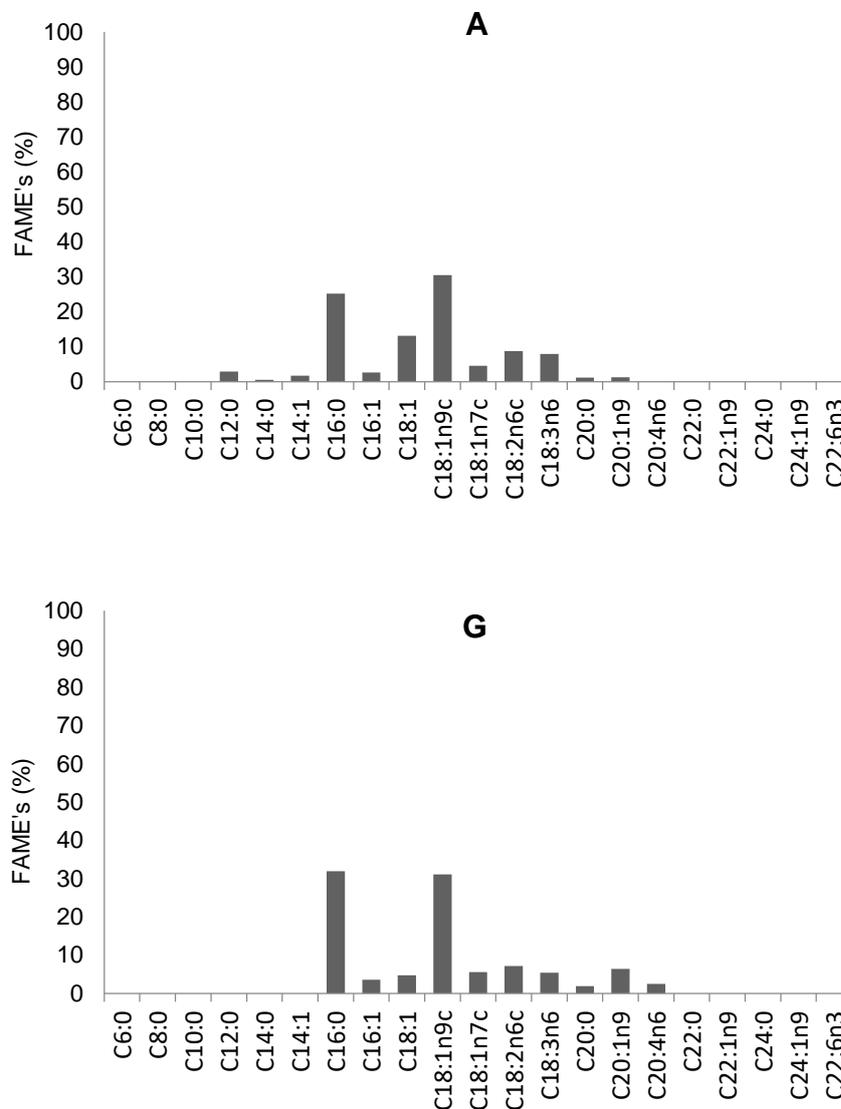
Fonte: A Autora (2019).

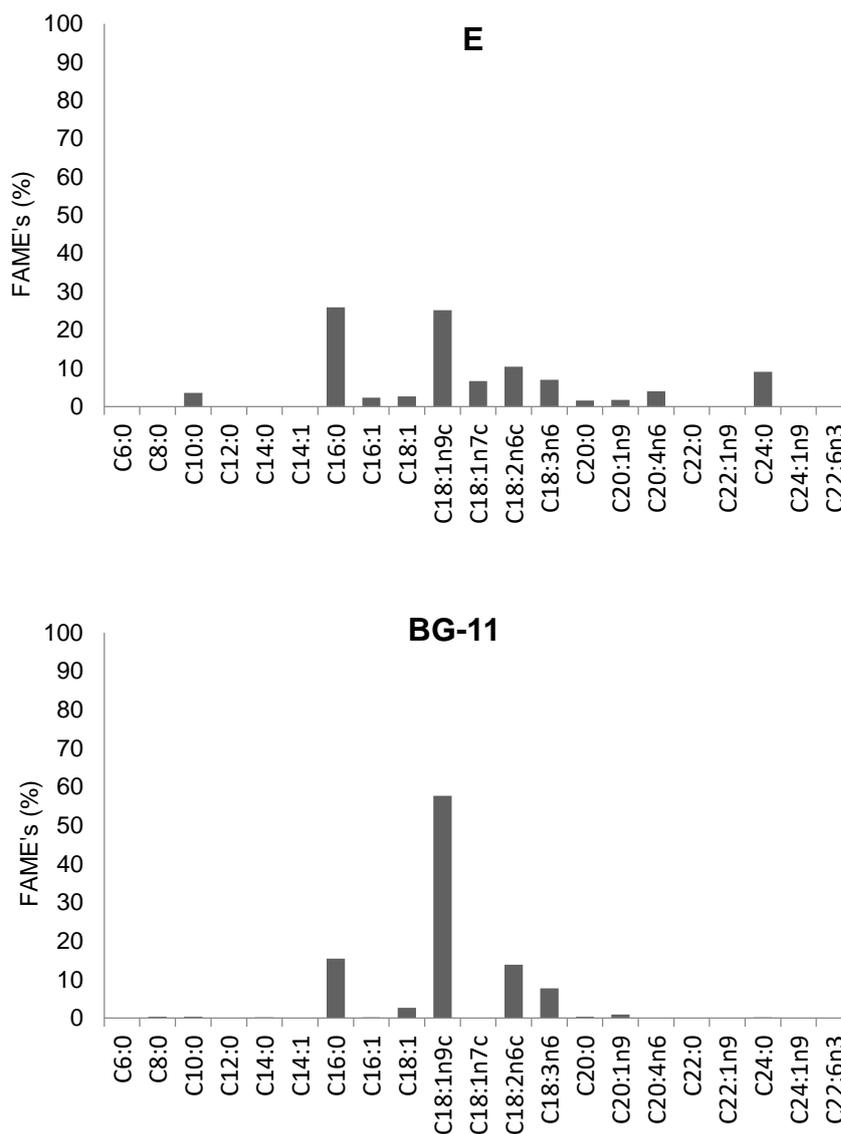
O padrão de distribuição dos FAMES foi semelhante nos reatores R1 e R2, havendo uma produção mais expressiva, dos compostos de 16 a 18 carbonos. O fator imobilização celular, parece não ter sido limitante na produção de FAMES de interesse à produção de biodiesel. Embora a fisiologia da espécie tenha sido afetada em termos de produção global de

FAMEsela não foi afetada quanto ao nível de distribuição de FAMES (normalmente produzidos pelo grupo).

Na Fase II, Figura 67 abaixo, a distribuição de FAMES obteve o mesmo comportamento observado na Fase I, com a produção mais expressiva de compostos contendo de 16 a 18 carbonos.

Figura 68 - Percentagem de FAMES produzidos pela biomassa cultivada em fluente têxtil utilizando amido (A), glicose (G), etanol (E) como fonte de carbono e meio BG-11 (controle), durante a Fase II.





Fonte: A Autora (2019).

O cultivo controle, teve comportamento semelhante em termos de distribuição da produção, havendo uma produção expressiva do C:18:0, que foi o responsável pela maior parte da produção de AG's na biomassa controle.

6 CONCLUSÕES

Baseado em todas as observações ressaltadas nos resultados acima, as conclusões seguem na ordem abaixo:

6.1 EXPERIMENTO 1

- Relações C:N mais próximas à 6:1, elevadas, favoreceram as taxas de crescimento das espécies, e reduziram ligeiramente as taxas de captura de nutrientes, dadas as mais elevadas concentrações destes no meio em que essas proporções foram observadas.
- Relações C:N muito reduzidas (3:1), favoreceu a estocagem intracelular de óleo total, porém desfavoreceu o rendimento global de óleo, visto que a produtividade de biomassa foi afetada negativamente por baixas relações C:N.
- As concentrações de FAMES totais, foram aparentemente reduzidas em relação à concentração de óleos totais para as duas espécies.
- No entanto, em termos de distribuição dos FAMES produzidos, a relação C:N teve grande relevância para a *D. subspicatus*, onde verificou-se uma maior produção dos lipídeos contendo cadeias carbônicas entre C:16 e C:18, especialmente onde a relação C:N inicial esteve entre 5:1 e 6:1.

Nos cultivos onde houve uma relação inicial C:N mais desproporcional (daquilo que é considerada uma proporção ótima ao desenvolvimento máximo de microalgas, tais como 2:1, 3:1, 10:1 e 12:1, a produção de ácidos graxos foi mais distribuída sendo observada formação de lipídeos contendo cadeias carbônicas entre C:6 e C:24. Esta tendência não foi observada para *C. vulgaris*, que teve sua distribuição ampliada entre os C:6:0 e C:20:0, em todos os tratamentos.

- Estudos sobre a evolução da estocagem de FAMES ao longo do tempo de cultivo. Se faz necessário, um estudo de perfil de produção de FAMES para elucidar aspectos sobre a taxa de produção e consumo de ácidos graxos pela célula ao longo do tempo, e sob as mesmas condições do presente experimento.
- O melhor desenvolvimento das espécies esteve relacionado à presença massiva de bactérias e M.O dissolvida nos meios, e ao contínuo suprimento de C inorgânico fornecido por estas. Os meios que obtiveram as mais altas densidades de bactérias, em contrapartida, maiores concentrações de matéria orgânica (DBO). Dessa forma, um

melhor desenvolvimento pode estar relacionado ao consumo aeróbio da matéria orgânica, favorecendo o crescimento das microalgas nesses meios.

- Em geral, *D. subspicatus* teve produtividade e rendimento final de óleo, ligeiramente maiores que *C. vulgaris*. Essas diferenças estão relacionadas à biologia das espécies, que favorece *D. subspicatus*.
- Efluente bruto e efluente pós reator UASB, sugerem ser os melhores meios para o cultivo das espécies.

6.2 EXPERIMENTO 2

- No geral, os cultivos fotoheterotróficos favorecem a produção de biomassa, e óleo total em ambas as espécies;
- Ambas as espécies foram igualmente eficientes no tratamento do efluente doméstico bruto ao longo de 15 dias de cultivo.
- *D. subspicatus* foi favorecida em condições de maior período de iluminação, enquanto *C. vulgaris*, foi favorecida em maior período de fase escura, em termos de produção de biomassa, rendimento de óleos totais e remoção de nutrientes do meio.
- Em termos de rendimento de óleos totais comparado com uso de recursos energéticos, concluiu-se que *C. vulgaris*, embora tenha um rendimento global ligeiramente inferior do que *D. subspicatus*, produziu mais óleo total consumindo menos recursos energéticos (luz), para tratar de modo eficientemente semelhante, a mesma quantidade de esgoto doméstico bruto.
- Em relação ao rendimento total de FAMEs, *C. vulgaris* apresentou uma produção ligeiramente superior (7% a mais) do que *D. subspicatus*, sob o metabolismo de menor fase iluminada (10h:14h), indicando melhor produtividade utilizando menos recursos energéticos.
- A produção de FAMEs de interesse, foi direcionada aos ácidos graxos contendo cadeias entre C14:0 a C:18:0 em ambas as espécies. Indicando que o regime de iluminação aplicado, promoveu a produção do C14:0, um excelente ácido graxo na produção de biodiesel.

6.3 EXPERIMENTO 3

- Na Fase I, a cianobactéria *O. tennuis*, quando suspensa em cultivo, teve um melhor desempenho, em termos de remoção de cor e sulfatos (utilizando glicose como fonte de C e metabolismo autotrófico). Na Fase II, a cianobactéria *O. tennuis*, teve um melhor desempenho na remoção de DQO, N, P e salinidade do meio (utilizando glicose ou etanol, e sob metabolismo fotoheterotrófico 16h:10h), sugerindo que, uma combinação das duas fases de cultivo, para um mesmo efluente, poderia gerar um efluente com excelente qualidade para descarte final.
- Em relação à produtividade de FAMES, em geral, a cianobactéria não mostrou-se uma espécie promissora quando cultivada em efluente têxtil, obtendo resultados inferiores aos observados em seu controle contendo meio de cultivo BG-11.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M.B., **Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates**, J. Phycol. [s.l.], v.4, p.1–4. 1968.
- AMARAL, F. M. **Remoção de corante azo em sistemas de reator anaeróbio/aeróbio e em reator UASB micro-aerado**. 101 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2015.
- AMARO, Helena M.; GUEDES, A. Catarina; MALCATA, F. Xavier. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, Portugal, v. 88, n. 10, p.3402-3410, out. 2011.
- AMORIM, S. M.; KATO, M. T.; FLORÊNCIO, L.; GAVAZZA, S. Influence of redox mediators and electron donors on the anaerobic removal of color and chemical oxygen demand from textile effluent. **Clean – Soil, Air, Water**, 41(9): 928–933, 2013.
- ANDERSEN, R. J.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Avrainvilloside, a 6-Deoxy-6-aminoglucoglycerolipid from the green alga *Avrainvillea nigricans*, **J. Nat. Prod.** [s.l.], v. 68, p.1428–1430. 2005.
- ANDERSEN, R.A.; KAWACHI, M. **Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, Robert A. Algal culturing techniques**. Phycological Society of America.. cap.6, p.83-100. 2005.
- APHA, AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22 nd ed. Washington: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1594p. 2012.
- ARBIB, Zouhayr et al. Long term outdoor operation of a tubular airlift pilot photobioreactor and a high rate algal pond as tertiary treatment of urban wastewater. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 52, p.143-153, 2012.
- BAHADAR, Ali; KHAN, M. Bilal. Progress in energy from microalgae: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 27, p.128-148, nov. 2013.
- BALASUBRAMANIAN, R. et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.896-907, nov. 2011.
- BARBOSA, S.M.S. **Estudo da remoção de nitrogênio em uma lagoas de polimento tratando esgoto em escala real**. 2013. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- BECKER, E.W. **Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge studies in biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press; 239pp. 1994.

BEER, Laura L et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.264-271, jun. 2009.

BENEMANN J.R. **Opportunities and challenges in algae biofuels production** - A Position Paper. by Dr. John R. Benemann in line with Algae World. 2008a.

BENEMANN, J.R. The Controlled Eutrophication Process Using Microalgae for CO₂ Utilization and Agricultural Fertilizer Recycling. **Greenhouse Gas Control Technologies - 6th International Conference**, [s.l.], p.1433-1438, 2003.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [s.l.], vol.26, p.9-20. 2008.

BOER, K. Bahri, Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption, **J. Appl. Phycol.** [s.l.], v.24, n.6, p. 1681–1698. 2012.

BOUTERFAS, R., BELKOURA, M., & DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, 489(1), 207–217. <https://doi.org/10.1023/A:1023241006464>. 2002.

BRENNAN, L. OWENDE, P. Biodiesel from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biodiesel and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.2, p.557-577. 2010.

CÁCERES, M. MEGHARAJ, R. NAIDU, Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of green algae and cyanobacteria, **Curr. Microbiol.** 57 643–646. 2008.

CÁCERES, T, MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Biodegradation of the pesticide fenamiphos by ten different species of green algae and cyanobacteria. **Curr Microbiol.** [s.l.], v.57, p.643–6. 2008a.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003. 255p.

CARPIO, Rowena B. et al. Growth, lipid content, and lipid profile of the green alga, *Chlorella vulgaris* Beij., under different concentrations of Fe and CO₂. **Journal of Engineering Science and Technology**. [s.l.], v. 6, n. 1, p.19-30. Jan. 2015.

CARVALHO, A. MALCATA, X. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v.53, p. 5049–5059. 2005.

CAUCHIE, H.M., HOFFMANN, L., JASPAR-VERSALI, M.F., SALVIA, M., THOMÉ, J.P. *Daphnia magna* Straus living in an aerated sewage lagoon as a source of chitin: ecological aspects. **J. Zool.**, 125:67–78. 1995.

CHELF P, BROWN LM, WYMAN CE. Aquatic biomass resources and carbon dioxide trapping. **Biomass and Bioenergy**;4 (3):175–83. 2010.

- CHEN, Chun-yen et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.71-81, jan. 2011.
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.126-131, mar. 2008.
- CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007.
- COHEN, Z. Production potential of eicosapentaenoic acid by *Monodus subterraneus*. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 71, 941–945. 1994.
- COLLA, L.M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, vol.59c, p. 55-59. 2004.
- COSTA, J.A.V. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição**, vol.17, n.4, p.429-436. 2006b.
- CROMAR, N.J.; FALLOWFIELD, H.J. Use of image analysis to determine algal and bacterial biomass in a high rate algal pond following Percoll® fractionation. **Water Sci Technol.** [s.l.], v.48, p.53–60. 2003.
- DE PAUW, N.; MORALES, J.; PERSOONE, G. Mass culture of microalgae in aqua- culture systems: progress and constraints. **Hydrobiologia**; 116/117: p.121–134. 1984.
- DELLAMATRICE, P. M., SILVA-STENICO, M. E., MORAES, L. A. B. DE, FIORE, M. F., & MONTEIRO, R. T. R. Degradation of textile dyes by cyanobacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48(1), 25–31. 2017.
- DOS SANTOS, A. B. **Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge**. 176 p. Tese (Pós-doutorado). Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, 2005.
- DOS SANTOS, A. B.. **Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge**. 176p. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 2005.
- EL-KASSAS, Hala Yassin; MOHAMED, Laila Abdelfattah. Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. **The Egyptian Journal Of Aquatic Research**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.301-308, 2014.
- EL-SHEEKH, Mostafa M.; GHARIEB, M.m.; ABOU-EL-SOUOD, G.w.. Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 63, n. 6, p.699-704, set. 2009.

- FALLOWFIELD, H. J. et al.. Influence of environmental parameters on biomass production and nutrient removal in a high rate algal pond operated by continuous culture. **Water Science Technology**, [s.l.], v. 34, n.11, p. 133-140. 1996.
- FLORENCIO, L.; JENIČEK, P.; FIELD, J. A.; LETTINGA, G. Effect of cobalt on the anaerobic degradation of methanol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 368-374, 1993.
- FRANCO, André L. C. et al. BIODIESEL DE MICROALGAS: AVANÇOS E DESAFIOS. **Quim. Nova**, Brasil, v. 36, No. 3, p.437-448, 2013.
- GONÇALVES E.A.P. **Ecologia de cianobactérias no semiárido pernambucano**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- GRIMA, e Molina et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 20, n. 7-8, p.491-515, jan. 2003.
- HALIM, R., GLADMAN, B., DANQUAH, M. K., & WEBLEY, P. A. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. **Bioresource Technology**, 102(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.136>. 2011.
- HARRIS, G.P. **Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton**. *Ergebnisse der limnologie* 10, 1–171. 1978.
- HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14 , p.1037-1047, 2010.
- HASSAN, Fikrat M. Stimulation of biodiesel production from two algae: *Chlorella vulgaris* Berjerinck and *Nitzschia palea* (Kütz.) Smith, and study their some growth parameters under different light intensity.. *Iosr Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.31-42, 2013.
- HEREDIA-ARROYO, Tamarys. et al. **Oil accumulation via heterotrophic/ mixotrophic *Chlorella protothecoides***. *Appl. Biochem. Biotech.* 2010.
- HO, S.H., et al. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**. v. 105, p.106–113, 2011.
- HU, G. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, p.621-639, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38–46, 2010.
- HUNTLEY M.E; REDALJE D.G. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**. v.12, p. 573-608, 2007.

- KAGAMI, M. et al.. Parasitic chytrids: their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. **Hydrobiologia**. [s.l.], v. 578, p.113–129. 2007.
- LEVY, J. L., STAUBER, J. L., & JOLLEY, D. F. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. **Science of the Total Environment**, 387 (1–3), 141–154. 2007.
- LI, X. et al.. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2008.
- LIANG, YANNA; SARKANY, NICOLAS; CUI, YI. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.1043-1049, 27 mar. 2009.
- LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Brasil: RiMa, 2006.
- MACEDO, M.F. et al..The influence of incubation periods on photosynthesis–irradiance curves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. [s.l.], v.274, p.101–120. 2002.
- MANDALAM, R.K.; PALSSON, B.Ø.. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. **Biotechnol. Bioeng.** [s.l.], v.59, p.605-611. 1998.
- MARCELINO, D.; TEIXEIRA, G.; ZAIAT, M.; GAVAZZA, S. Textile effluent treatment by sequential horizontal-flow immobilized sludge reactors. **13th World Congress on Anaerobic Digestion**, IWA, Santiago de Compostela, Spain, 2013.
- MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S..Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.217-232, jan. 2010.
- MAYO, A.W.; NOIKE, T..Effects of temperature and pH on the growth of heterotrophic bacteria in waste stabilization ponds. **Water Science and Technology**, v. 30, n. 2, p. 447 – 455. 1994.
- MEHER, L.C. et al.. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renew. Sust. Energy Rev.** [s.l.], v. 10, n. 3, p.248–268. 2006.
- METCALF; EDDY, (2012). **Wastewater engineering – treatment disposal reuse**. 3ed. McGraw-Hill International Edition. 1334p.
- MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p.841-846, 2006.
- MORAIS, M.G.. COSTA, J.A.V. Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide, **Ciênc. agrotec.**, v. 32, p. 1245–1251. 2007.

MURADYAN, E. A. et al. Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration. **Russian Journal Plant Physiology**, v. 51, p. 53-62. 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 3.^a ed. São Paulo: Sarvier Editora Ltda, 955p. 2002.

O'GRADY, J.; MORGAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol.34, p. 121–125, 2011.

ORAN, N. J. **Water Stabilization Ponds and Aerated Lagoons. Biological Wastewater treatment Systems, Theory and operation**. Library of cataloging, chap. 10, p.286-287. 1989.

ORON, G.; SHELEF G. Maximizing algal yield in high rate oxidation ponds. **Journal of the Environmental**. Divisin, v. 108, n. EE4, August, p.730-737. 1982.

OSWALD, William J. My sixty years in applied algology. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 15, n. 2/3, p.99-106, mar. 2003.

OWENDE, P. BRENNAN, L. Biodiesel from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biodiesel and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, n.2, p.557-577. 2010.

PAIVA, M.V.C. **Dinâmica da comunidade fitoplanctônica em um sistema de tratamento de esgotos no litoral de Pernambuco**. 2012. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.633-639, fev. 2010.

PARK, J.B.K. et al. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**. [s.l.], v.102, n.1, p.35-44, 2011a

PARK, Jongmin et al. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 22, p.8649-8657, nov. 2011 b.

PEREZ-GARCIA, Octavio et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.11-36, jan. 2011.

PIRES, J. C. M. et al. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.5096-5105, 15 maio 2013.

PROVASOLI, L. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Cultures and Collections of Algae. Proceedings of the U.S. – Japan Conference (Watanabe, A. & Hattori, A., eds.). **Japanese Society of Plant Physiology**, Hakone, 1968. p.63-75. 1968.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. [s.l.], v.57, n.3, p.287–93. 2001.

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

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Science Ltd. Blackwell. 2004.

RICHMOND, A. et al. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the population density and the cell growth inhibition. **Biomol. Eng.** 20, 229–236. 2003.

ROOSTAEI, Javad et al. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, 21 ago. 2018.

SALOMONI, S.E. **Aspectos da limnologia e população costeiras Marcelino, Peixoto e Pinguela** (Osório, RS): uma abordagem baseada no fitoplâncton. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Instituto de Biociências. UFRGS. Porto Alegre, RS, 141p. 1997.

SIAUT, M., S. CUINE, et al. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, [s.l.], v.11, n.1, 2011.

SOEDER, C.J., HEGEWALD, E., FIOLITAKIS, E., GROBBELAAR, J.U. Temperature dependence of population growth in a green microalga: thermodynamic characteristics of growth intensity and the influence of cell concentration. **Zeitschrift fur Naturforschung** 40c, 227–233. 1985.

SUBASHCHANDRABOSE, Suresh R. et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.896-907, nov. 2011.

SUH I.S, LEE S.B. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering** 2003;82:180–9. 2010.

SUTHERLAND, D.L. et al.. Seasonal variation in light utilisation, biomass production and nutrient removal by wastewater microalgae in a full-scale high rate algal pond. **J. Appl. Phycol.** [s.l.], v. 25, n. 5. 2014.

TILLET, D.M., **Lipid productivity and species competition in laboratory models of algae mass cultures**. PH.D. THESIS, The School of Chemical Engineering, Georgia Institute of Technology. 1988.

TORZILLO, G., PUSHPARAJ, B., MASOJIDEK, J., VONSHAK, A., Biological constraints in algal biotechnology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 8, 338– 348. 2003.

TREDICI, M.R. **Mass production of microalgae: photobioreactors.** In: **Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgae Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** Blackwell Publishing, Oxford, p.178–214. 2004.

UNNITHAN, Veena V.; UNC, Adrian; SMITH, Geoffrey B. Role of Nannochloropsis salina for the recovery and persistence of MS2 virus in wastewater. **Algal Research**, [s.l.], v. 4, p.70-75, abr. 2014.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) – *Method – 300.0 – Determination of inorganic anions by ion chromatography*, 1993

VALERO, M. A. C.; MARA, D. D. Nitrification–denitrification in WSP: a mechanism for permanent nitro- gen removal in maturation ponds. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 61, n. 5, p.1137–1146. 2010.

VAN DER ZEE, F. P. **Anaerobic azo dye reduction.** 142p. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 2002.

VAN HARMELEN, T.; OONK, H. Microalgae biofixation processes: applications and potential contributions to greenhouse gas mitigation options. Apeldoorn, The Netherlands: **International Network on Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae**; 2006.

VAN WYCHEN; LAURENS, L.M.L. Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by In Situ Transesterification, **NRE**, p. 275–3000. 2013.

WANG, B. et al. Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized Scenedesmus sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 9, p.3787-3793, jun. 2008.

WANG, Liang et al. Cultivation of Green Algae Chlorella sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 162, n. 4, p.1174-1186, 24 nov. 2011.

WHITE, D.A.; PAGARETTE, A.; ROOKS, P. The effect of sodium bicarbonate supplementa- tion on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **J Appl Phycol**, [s.l.], v.25, n.1, p.153-165.2013.

WOOD, A. M.; EVERROAD, R. C.; WINGARD, L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques.** United States of America: Elsevier Inc. p.269-285. 2005.

WU, SHUBIAO et al. Treatment of anaerobic digestate supernatant in microbial fuel cell coupled constructed wetlands: Evaluation of nitrogen removal, electricity generation, and bacterial community response. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 580, p.339-346, fev. 2011.

XIN, L., et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v.101,p. 5494-5500, 2010.

XU, H. et al. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 126, p. 499–507. 2006.

ZHANG, E., WANG, B., WANG, Q., ZHANG, S., & ZHAO, B. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **Bioresource Technology**, 99(9), 3787–3793. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.011>. 2008.

ZHANG, X.-W. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. **Process Biochem.** [s.l.], v.34, p.341-347. 1999.

ANEXO A - Estadística

EXPERIMENTO I

D. SUBSPICATUS

Efluentes de A

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test

P value	0,031
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	1,941

Data summary

Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	45

Number of families	1
Number of comparisons per family	66
Alpha	0,05

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?
A vs. AF	22,37	No
A vs. AF+A	7,667	No
A vs. E1	25,77	Yes
A vs. E1F	50,53	Yes
A vs. E1F+A	21,70	No
A vs. E2	7,033	No
A vs. E2F	20,87	No
A vs. E2F+A	-4,867	No
A vs. E3	19,73	Yes
A vs. E3F	32,73	No
A vs. E3F+A	38,07	No
AF vs. AF+A	-14,70	No
AF vs. E1	3,400	No
AF vs. E1F	28,17	No
AF vs. E1F+A	-0,6667	No
AF vs. E2	-15,33	No
AF vs. E2F	-1,500	No
AF vs. E2F+A	-27,23	No
AF vs. E3	-2,633	No
AF vs. E3F	10,37	No
AF vs. E3F+A	15,70	No
AF+A vs. E1	18,10	No
AF+A vs. E1F	42,87	No
AF+A vs. E1F+A	14,03	No
AF+A vs. E2	-0,6333	No
AF+A vs. E2F	13,20	No
AF+A vs. E2F+A	-12,53	No
AF+A vs. E3	12,07	No

AF+A vs. E3F	25,07	No
AF+A vs. E3F+A	30,40	No
E1 vs. E1F	24,77	No
E1 vs. E1F+A	-4,067	No
E1 vs. E2	-18,73	No
E1 vs. E2F	-4,900	No
E1 vs. E2F+A	-30,63	No
E1 vs. E3	-6,033	No
E1 vs. E3F	6,967	No
E1 vs. E3F+A	12,30	No
E1F vs. E1F+A	-28,83	No
E1F vs. E2	-43,50	No
E1F vs. E2F	-29,67	No
E1F vs. E2F+A	-55,40	No
E1F vs. E3	-30,80	No
E1F vs. E3F	-17,80	No
E1F vs. E3F+A	-12,47	No
E1F+A vs. E2	-14,67	No
E1F+A vs. E2F	-0,8333	No
E1F+A vs. E2F+A	-26,57	No
E1F+A vs. E3	-1,967	No
E1F+A vs. E3F	11,03	No
E1F+A vs. E3F+A	16,37	No
E2 vs. E2F	13,83	No
E2 vs. E2F+A	-11,90	No
E2 vs. E3	12,70	No
E2 vs. E3F	25,70	No
E2 vs. E3F+A	31,03	No
E2F vs. E2F+A	-25,73	No
E2F vs. E3	-1,133	No
E2F vs. E3F	11,87	No
E2F vs. E3F+A	17,20	No
E2F+A vs. E3	24,60	No
E2F+A vs. E3F	37,60	No
E2F+A vs. E3F+A	42,93	No
E3 vs. E3F	13,00	No
E3 vs. E3F+A	18,33	No
E3F vs. E3F+A	5,333	No

D. SUBSPICATUS

Efluentes de E1

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test	
P value	0,1805
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0,8200

Data summary

Number of treatments (columns)	3
--------------------------------	---

Number of values (total) 18

D. SUBSPICATUS

Efluentes de E2

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test

P value 0,1873

Exact or approximate P value? Approximate

P value summary ns

Do the medians vary signif. (P < 0.05)? No

Number of groups 3

Kruskal-Wallis statistic 3,350

Data summary

Number of treatments (columns) 3

Number of values (total) 45

D. SUBSPICATUS

Efluentes de E3

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test

P value 0,6658

Exact or approximate P value? Approximate

P value summary ns

Do the medians vary signif. (P < 0.05)? No

Number of groups 3

Kruskal-Wallis statistic 0,8135

Data summary

Number of treatments (columns) 3

Number of values (total) 45

EXPERIMENTO I

C. VULGARIS

Efluentes de A

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test

P value 0,7286

Exact or approximate P value? Approximate

P value summary ns

Do the medians vary signif. (P < 0.05)? No

Number of groups 3

Kruskal-Wallis statistic 0,6331

Data summary

Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	45

Efluentes de E1

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test	
P value	0,00206
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	0,6331

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	45

Efluentes de E2

Table Analyzed	Ozone correlations
----------------	--------------------

Kruskal-Wallis test	
P value	0,073
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	3,350

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	45

Efluentes de E3

Table Analyzed

Kruskal-Wallis test	
P value	0,7256
Exact or approximate P value?	Approximate
P value summary	ns
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	No
Number of groups	3
Kruskal-Wallis statistic	5,253

Data summary	
Number of treatments (columns)	3
Number of values (total)	44