

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA**

Júlia Fonseca Dutra
Graduanda em Biotecnologia - Bacharelado

**AVALIAÇÃO DO CO-CULTIVO DE BACTÉRIAS E MICROALGA
CHLORELLA SOROKINIANA NO TRATAMENTO DE EFLUENTES**

São Carlos - SP
2021

Júlia Fonseca Dutra

**AVALIAÇÃO DO CO-CULTIVO DE BACTÉRIAS E MICROALGA
CHLORELLA SOROKINIANA NO TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), como parte das exigências para a obtenção do título de **Bacharel em Biotecnologia**.

Orientador: Prof.º Dr. Clovis W. O. de Souza.

São Carlos – SP

2021

Dutra, Julia Fonseca

Avaliação do co-cultivo de bactérias e microalga
Chlorella sorokiniana no tratamento de efluentes / Julia
Fonseca Dutra -- 2021.
62f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Clovis Oliveira de Souza
Banca Examinadora: Ana Paula Erbetta, Valdinei Belini
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Microalgas. 3. Tratamento de
efluentes. I. Dutra, Julia Fonseca. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325

AGRADECIMENTOS

À minha família, Alaércio, Flávia, Fernanda e Max, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todos os momentos, alegrando meus dias e me tornando a pessoa que sou hoje;

Ao meu orientador, Prof.^o Dr. Clovis de Souza, por toda a ajuda, paciência, compreensão e ensinamentos compartilhados durante todo o desenvolvimento deste projeto;

À Zélia Venézio e ao Matheus Darone, por toda a imensa ajuda o tempo todo, além das ótimas conversas;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, pela companhia, ajuda e apoio na realização das atividades;

Aos amigos que a universidade me deu, que me mostraram novos horizontes e me tornaram uma melhor amiga, pessoa e profissional;

À Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi, por disponibilizar a estrutura de seu laboratório e equipamentos necessários para a realização dos experimentos, também à Jaqueline e ao Douglas por me ensinarem e ajudarem a utilizá-los;

Ao curso de Bacharelado em Biotecnologia e à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao Departamento de Morfologia e Patologia e todos seus funcionários;

Aos membros da banca, Dr.^a Ana Paula Erbeta e Prof. Dr. Valdinei Belini, por aceitarem compartilhar este momento importante comigo e por todo o suporte no desenvolvimento do projeto;

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A poluição é um problema social e de saúde, e a falta de tratamento de esgoto e seu despejo incorreto é uma das maiores fontes de poluição aquática. As microalgas são microrganismos que têm potencial para o tratamento terciário de esgoto, pois são resistentes à variação de temperatura e luminosidade, sintetizando compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono, permitindo a sustentação de organismos heterotróficos, como as bactérias, que os decompõem e reciclam elementos. Algumas bactérias, por sua vez, utilizam também o oxigênio produzido pelas microalgas e produzem compostos que promovem o crescimento vegetal. O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de bactérias e microalgas *C. sorokiniana* atuarem em co-cultivo na promoção de crescimento microalgal e remoção de nutrientes do esgoto. Para isso, foram realizadas quatro bateladas comparando o desempenho dos microrganismos em efluente de suinocultura e efluente de reator UASB da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Monjolinho, avaliando a influência do co-cultivo e da aeração no crescimento microalgal e remoção de fósforo e nitrogênio dissolvidos durante os cultivos. Foram analisados os desempenhos: da microalga sozinha, com consórcio de bactérias de biofilme, com bactéria solubilizadora de fosfato e bactéria produtora de AIA (ácido indol acético). As bateladas foram realizadas em fracos de 2 litros com 1 litro de volume de efluente a 27°C ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12/12 horas, com inóculos de algas e bactérias com concentrações 10^5 e 10^4 cel/ml, respectivamente. Os resultados obtidos com o efluente de reator UASB foram superiores aos resultados com efluente de suinocultura, atingindo a concentrações de 10^7 cel/ml. Analisando o crescimento celular, nenhum dos consórcios apresentou resultados superiores à amostra controle, que continha apenas a microalga. Porém, analisando a remoção de fósforo e nitrogênio, o consórcio com a bactéria solubilizadora de fosfato se destacou, apresentando de remoção de fósforo de 84% da concentração inicial. Portanto, visando tratamento de efluentes e remoção de nutrientes, o consórcio de *C. sorokiniana* e bactéria solubilizadora de fosfato se mostrou promissor.

Palavras-chave: consórcio de microalgas e bactérias, *C. sorokiniana*, nitrogênio total dissolvido, fósforo total dissolvido, AIA.

Evaluation of bacteria and microalgae *Chlorella sorokiniana* co-culture in the wastewater treatment

Pollution is a social and health problem, the lack of sewer treatment together with its incorrect disposal are one of the leading sources of aquatic pollution. Microalgae are microorganisms which have the potential for tertiary sewer treatment since they are resistant to temperature and luminosity variations, are able to synthesize organic compounds from carbon dioxide, providing sustenance for heterotrophic organisms, such as bacteria, who will decompose it and recycle it. On the other hand, some bacteria use the produced oxygen by the microalgae and produce compounds that increase vegetal growth. The objective of this study was to verify bacteria and microalgae *C. sorokiniana* capacity to promote microalgal growth and remove nutrients from the system. With that considered, four batches were analyzed, comparing microorganisms' performance in piggery effluent and in the UASB reactor effluent from Monjolinho's Sewage Treatment Station, evaluating the co-culture and aeration influence in microalgal growth, as well as the dissolved phosphorus and nitrogen removal. Four different samples were evaluated: microalgae alone, with biofilm bacteria consortia, with phosphorus solubilizing bacteria and with IAA (indole acetic acid) producer bacteria. All four batches were carried in 2-liter flasks with 1 liter of effluent volume, at 27°C ($\pm 4^\circ\text{C}$) with 12/12 hours photoperiod and inoculated with 10^5 and 10^4 cell/ml microalgae and bacteria, respectively. The results obtained with the UASB reactor effluent were superior to those with piggery effluent, achieving 10^7 cell/ml. Analyzing cellular growth, none of the consortia reached superior results when compared to microalgae alone. However, when analyzing phosphorus and nitrogen removal, the consortia with the phosphorus solubilizing bacteria stood out, achieving phosphorus removal of 84% from the initial concentration. Therefore, aiming for the effluent treatment and nutrient removal, the *C. sorokiniana* and phosphorus solubilizing bacteria consortia have showed itself promising.

Keywords: microalgae and bacteria consortia, *C. sorokiniana*, dissolved nitrogen, dissolved phosphorus, indole acetic acid (IAA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre a concentração de células por ml de cada amostra da batelada 1 no 12º dia de cultivo.	32
Tabela 2. Relação entre a concentração de células por mililitro das amostras da batelada 2 no décimo segundo dia, último dia de cultivo.	35
Tabela 3. Dados da literatura em relação aos microrganismos, meio de cultivo utilizados e concentração celular final alcançada.....	37
Tabela 4. Relação entre a concentração de células por mililitro de cada amostra da batelada 3 no último dia de cultivo, sétimo dia.	41
Tabela 5. Taxas de remoção de nitrogênio e fósforo obtidas em outros estudos.	46
Tabela 6. Relação entre a média da concentração de células por mililitro de cada amostra da batelada 4 no sétimo e no décimo segundo dias de cultivo.	48
Tabela 7. Comparação entre tempo de duração e resultados de concentração celular final das bateladas de diferentes artigos.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das cinco amostras analisadas nas bateladas.	24
Figura 2. Foto das amostras da batelada 1 ao início do experimento. Da esquerda para a direita, as amostras são: AIA, CS, EF, BIOF e SP.	29
Figura 3. Valores de pH das amostras ao longo do cultivo da batelada 1.....	30
Figura 4. Valores de absorvância das amostras ao longo do cultivo da batelada 1..	30
Figura 5. Dados de nitrogênio e fósforo totais dissolvidos nas amostras em 0 dias e 12 dias do cultivo da batelada 1.	31
Figura 6. Variação da densidade populacional na batelada 1.	32
Figura 7. Variação da fluorescência em função do tempo durante a batelada 1.....	33
Figura 8. Curva de crescimento microbiano em função do tempo de cultivo. Adaptado de Tortora, capítulo 6 (2012).	33
Figura 9. Valores de absorvância obtidos durante o cultivo da batelada 2 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	34
Figura 10. Valores de pH medidos durante o cultivo da batelada 2 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	34

Figura 11. Variação da densidade populacional em função do tempo na batelada 2 das amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	35
Figura 12. Variação da fluorescência em função do tempo para as amostras da batelada 2. Na esquerda estão representadas as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração.....	36
Figura 13. Foto das amostras da batelada 3 ao início do experimento. À frente estão as amostras sem aeração e ao fundo as amostras com aeração.....	38
Figura 14. Valores de absorbância obtidos durante o cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	38
Figura 15. Valores de pH obtidos durante o cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	39
Figura 16. Valores de nitrogênio total dissolvido em 0 e 7 dias de cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	40
Figura 17. Valores de fósforo total dissolvido em 0 e 7 dias do cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.	40
Figura 18. Variação da densidade populacional para as amostras da batelada 3. Na esquerda estão as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração. .	41
Figura 19. Variação da fluorescência em função do tempo para as amostras da batelada 3. Na esquerda estão representadas as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração.....	42
Figura 20. Fotos das amostras da batelada 3 no sétimo dia de cultivo, com as amostras sem aeração à frente e com aeração ao fundo. A: amostras EF; B: amostras CS; C: amostras BIOF; D: amostras SP; E: amostras AIA.....	43
Figura 21. Valores de absorbância obtidos até o sétimo dia de cultivo da batelada 4.	44
Figura 22. Valores de pH obtidos até o sétimo dia de cultivo da batelada 4.....	44
Figura 23. Valores de nitrogênio e fósforo total dissolvido em 0 e 7 dias de cultivo da batelada 4.	45
Figura 24. Crescimento da batelada 4. A: Variação da densidade populacional. B: Variação da fluorescência.....	47
Figura 25. Resultados obtidos para o Teste de Tukey com a realização do ANOVA de um fator com os dados de 5, 7, 9 e 12 dias de cultivo da batelada 4. (A) amostras CS; (B) amostras BIOF; (C) amostras SP e (D) amostras AIA.	49
Figura 26. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra CS. .	50

Figura 27. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra CS na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.	51
Figura 28. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra BIOF.	52
Figura 29. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra BIOF na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.	52
Figura 30. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra SP...	53
Figura 31. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra SP na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.	53
Figura 32. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra AIA..	54
Figura 33. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra AIA na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.	55

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AIA – Ácido indol-3-ácetico;

CCP – Cloreto de cetilpiridínio;

PBS – Do inglês *Phosphate-buffered saline*

TSB – Caldo Triptona de Soja (do inglês, *Tryptone Soy Broth*);

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

RFU – Unidades de Fluorescência Relativa (do inglês, *Relative Fluorescence Units*);

DS – Frasco controle negativo, apenas dejetos suíno;

EF – Frasco controle negativo, apenas com o efluente;

CS – Frasco controle positivo, com efluente e *Chlorella sorokiniana*;

BIOF – Frasco com efluente, *C. sorokiniana* e consórcios de bactérias de biofilme;

SP – Frasco com efluente, *C. sorokiniana* e bactéria solubilizadora de fosfato;

AIA – Frasco com efluente, *C. sorokiniana* e bactéria produtora da AIA;

SUMÁRIO

2. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 <i>Chlorella sorokiniana</i>	19
2.2 Co-cultivo de bactérias e microalgas	19
2.3 Remoção de nutrientes	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Cultivos dos microrganismos	23
4.1.1 Cultivo da microalga	23
4.1.2 Cultivo das bactérias	23
4.2 Condições do cultivo em batelada	24
4.2.1 Obtenção do efluente de suinocultura (Bateladas 1 e 2).....	24
4.2.2 Obtenção do efluente de reator UASB (Bateladas 3 e 4).....	25
4.3 Quantificação de nutrientes	25
4.4 Indicadores do crescimento das microalgas	25
4.4.1 Densidade populacional	25
4.4.2 Fluorescência	26
4.4.3 Análise por imagens.....	26
4.5 Análise Estatística.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Batelada 1	29
5.2 Batelada 2.....	33
5.3 Batelada 3.....	37
5.4 Batelada 4.....	43
6. CONCLUSÃO.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57
Anexo I – Composição dos meios de cultura	61

2. INTRODUÇÃO

É de conhecimento público que problemas associados à poluição são uma enorme preocupação da sociedade, sendo uma questão alarmante em termos de saúde, meio ambiente e economia. E uma das maiores fontes de poluição aquática é o despejo incorreto e falta de tratamento de esgoto (ABDEL-RAOUF et al., 2012).

Um dos maiores efluentes agroindustriais do mundo é o efluente de suinocultura, que, quando não manejado de forma correta, pode causar problemas ambientais como eutrofização de corpos d'água, contaminação dos solos e poluição do ar por volatilização de NH_3 (GODOS et al., 2010).

O esgoto é uma mistura complexa de materiais orgânicos e inorgânicos, assim como compostos feitos pelo homem, provenientes das atividades domésticas, industriais e da agricultura (ABDEL-RAOUF et al., 2012). Sua composição é variável: as concentrações de nitrogênio e fósforo variam entre diferentes fontes de esgoto e até diária e sazonalmente, tornando o processo de tratamento complexo e caro. Tendo isso em vista, algas são uma alternativa cada vez mais estudada para tratamento de esgoto por serem eficientes na remoção de nitrogênio, fósforo e metais tóxicos, tendo papéis importantes na biorremediação como um tratamento terciário do mesmo (KLIGERMAN e BOUWER, 2015; MANTZOROU et al., 2018).

Microalgas são microrganismos fotossintéticos de tamanho celular entre 2 e 200 μm , com alta capacidade de fixação de dióxido de carbono (CO_2) e liberação de oxigênio (O_2). De um lado, possuem a habilidade de usar energia solar e CO_2 , de outro, certas espécies têm a capacidade de acumular quantidades consideráveis de amido. Esse acúmulo, por exemplo, torna a biomassa de microalga desejável como uma potencial fonte para a transformação de amido em glicose e consecutivamente em etanol por processos de fermentação, para a produção de biodiesel. Ou seja, a biomassa proveniente do tratamento de esgoto ainda é muito estudada para ser utilizada na produção de combustíveis (VELAZQUEZ-LUCIO et al., 2018). O uso de microalgas tem sido considerado uma solução promissora para o tratamento de efluentes devido à sua habilidade de esgotamento de nutrientes inorgânicos, tais como nitrogênio e fósforo (WANG et al., 2016).

Além disso, o oxigênio liberado pelas microalgas serve como fonte para o desenvolvimento e crescimento de organismos heterotróficos como bactérias, necessárias para a degradação de matéria orgânica. Ao mesmo tempo, as bactérias

liberam dióxido de carbono e nutrientes necessários às microalgas durante a fotossíntese. Assim, o co-cultivo de microalgas e bactérias vem sendo cada dia mais estudado como uma forma de aumentar a eficácia do processo de tratamento de esgoto (GODOS et al., 2010).

Na literatura já existem inúmeros casos de co-cultivos de microalgas e bactérias para tratamento terciário de esgoto, principalmente usando as espécies *Chlorella vulgaris* e *C. sorokiniana* em conjunto com bactérias como *Pseudomonas diminuta* e *P. vulgaris* e até mesmo fungos (DE-BASHAN, 2002; SANTOS e REIS, 2014). Godos et al. (2010), por exemplo, com consórcio envolvendo *C. sorokiniana*, obteve resultados de concentração celular final superiores a $8,0 \cdot 10^7$ cel/ml. E Liang et al. (2013), com consórcio de *C. vulgaris* e *B. lincheniformis*, obteve remoção de 78% do nitrogênio e 92% do fósforo dissolvidos.

Neste estudo, foram realizados experimentos de co-cultivo de microalgas da espécie *Chlorella sorokiniana* com diferentes bactérias para avaliar o crescimento microalgal e a remoção de nutrientes totais dissolvidos (fósforo e nitrogênio) de efluentes.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 *Chlorella sorokiniana*

As microalgas são um enorme grupo de algas microscópicas, produtoras primárias em escala global e estão envolvidas em todos os ecossistemas marinho e de água doce, tratamentos de efluentes e alguns processos dos solos (HERNANDEZ et al., 2009). Espécies de microalgas adequadas para o tratamento terciário de esgoto são comumente estudadas e se destacam por muitas serem capazes de crescer em um amplo espectro de variação de temperatura, especialmente do gênero *Chlorella spp.*, que conseguem se adaptar entre 5 e 42°C (DE-BASHAN et al., 2008).

Dentre as microalgas estudadas para desenvolvimentos tecnológicos, são vistos mais de 30 gêneros diferentes, porém o gênero com maior ocorrência é *Chlorella*, com quase 50% das citações (ANDRADE e COLOZZI FILHO, 2014). De todas as espécies de *Chlorella*, *C. sorokiniana* é a mais resistente ao calor e alta intensidade luminosa, sendo amplamente estudada para produção de biomassa e estudos sobre fotossíntese. Apesar do seu uso em tratamento de efluentes ser realizado sob condições moderadas de calor e luz, sua resistência a essas variáveis a torna mais adaptável em diferentes condições de cultivo (DE-BASHAN et al., 2008). Além disso, ela também tem sido utilizada para produção de importantes antioxidantes comerciais como luteína e α/β caroteno, entre outros (KUMAR e DAS, 2012).

Para estas espécies de microalgas, a forma de cultivo mais utilizada é o chamado cultivo mixotrófico. Nele, são explorados os metabolismos autotróficos e heterotróficos dos microrganismos ao mesmo tempo, visto que carbono orgânico e energia luminosa são fornecidos simultaneamente ao sistema. Estudos indicam que este tipo de cultivo afeta diretamente a concentração de células e a biomassa das algas, aumentando-as e melhorando a eficiência do seu metabolismo (LI et al., 2014; SFORZA et al., 2018).

2.2 Co-cultivo de bactérias e microalgas

Algas são produtoras primárias que sintetizam compostos orgânicos a partir de dióxido de carbono, assim elas sustentam organismos heterotróficos que decompõem compostos orgânicos e reciclam elementos. De acordo com estudos

prévios, as interações entre bactérias e algas são classificadas entre três tipos: troca de nutrientes, transdução de sinal e transferência gênica. Entre elas, a troca de nutrientes é a mais comum, pela produção de compostos orgânicos pelas algas e sua posterior decomposição pelas bactérias (KOUZUMA e WATANABE, 2015).

Muitos estudos mostram que bactérias têm um papel importante na produção em larga escala de microalgas, nos quais durante o co-cultivo algumas bactérias consomem o oxigênio produzido pelas microalgas para produzir compostos que promovem o crescimento vegetal, por exemplo, hormônios de crescimento como o ácido indol-3-acético (AIA) (DE-BASHAN et al., 2004; XUE et al., 2018).

A promoção de crescimento de microalgas por bactérias promotoras de crescimento tem sido relatada para algumas variedades de microalgas das espécies *C. vulgaris* e *C. sorokiniana* e diversas variedades de *Azospirillum spp.*, assim como algumas bactérias aquáticas e microalgas, majoritariamente fitoplâncton. O maior interesse nesta associação é recente e se deve ao fato de que as microalgas têm se mostrado mais eficientes na remoção de poluentes de efluentes em associação do que sozinhas (HERNANDEZ et al., 2009).

Além do crescimento em si, há estudos comprovando que a interação entre bactérias e microalgas tem efeitos diretos no metabolismo das mesmas, conseguindo, por exemplo, metabolizar nutrientes e metais pesados com maior eficiência (DE-BASHAN et al., 2004; KOUZUMA e WATANABE, 2015; XUE et al., 2018). Ainda, o co-cultivo de microalgas com bactérias é promissor para substituir sistemas de tratamentos biológicos convencionais que usam um único microrganismo (microalga ou bactéria), pois requer menor inserção de oxigênio e produtos químicos como tampões de pH ou agentes redutores para o processo de desnitrificação (QI et al., 2018). Por fim, bactérias ajudam na degradação de constituintes complexos em simples substâncias orgânicas que podem facilmente ser assimiladas pelas microalgas (ABINANDAN et al., 2018)

2.3 Remoção de nutrientes

A contribuição de efluentes ricos em nutrientes para a eutrofização de águas continentais e litorâneas tem resultado no aumento da demanda de remoção de nitrogênio e fósforo de esgotos municipais e industriais. Isto levou a um maior

interesse na otimização de várias fases microbianas envolvidas na remoção de nitrogênio, visando a redução do investimento e custos de operação em estações de tratamento (PENG et al., 2006).

Sedimentos ricos em nutrientes podem ser uma fonte interna de poluição em corpos de água pela liberação contínua de fósforo. Por ser o nutriente mais limitante para produção primária, excesso interno de fósforo está relacionado com a eutrofização, portanto existem diversos estudos sobre a sua remoção de forma eficiente (KIM et al., 2005).

A remoção de fósforo em efluentes pode ocorrer por meio de precipitação química ou pela assimilação biológica. Microalgas e outros organismos já presentes no esgoto requerem fósforo como um nutriente para seu crescimento. O desenvolvimento de microalgas em efluentes consome fósforo como um elemento essencial requerido para a fabricação de componentes celulares como fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucléicos, sendo que seu peso seco contem aproximadamente 1% de fósforo (POWELL et al., 2011).

Além disso, após a assimilação de nutrientes, a biomassa desses microrganismos ricos em nitrogênio e fósforo, por exemplo, tem o potencial de ser utilizada como fertilizantes para solos, para aumento da produção de plantações (ALORI et al., 2017a; KIM et al., 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a capacidade de bactérias e microalgas atuarem em co-cultivo na promoção de crescimento microalgal e remoção de nutrientes de efluentes.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o desempenho dos microrganismos em efluente de suinocultura e efluente de reator UASB em relação ao crescimento das microalgas e remoção de nutrientes
- Avaliar a influência do co-cultivo no crescimento da *Chlorella sorokiniana*
- Avaliar a influência da aeração no crescimento da *Chlorella sorokiniana*
- Avaliar o crescimento das microalgas durante o cultivo
- Avaliar a remoção de nitrogênio e fósforo do meio de cultivo
- Avaliar a influência do tempo de cultivo no crescimento microalgal

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivos dos microrganismos

4.1.1 Cultivo da microalga

A cultura axênica de *Chlorella sorokiniana* foi obtida por meio do tratamento com cloreto de cetilpiridínio (CCP), na concentração de 0,05%, adaptando o método proposto por Falkinham III e colaboradores (2001). Uma cultura de *C. sorokiniana* em meio BG11 (Anexo I, item 1.1) foi centrifugada a 1000G por 5 minutos e ressuspensa com 100µL de CCP, posteriormente incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a cultura foi novamente centrifugada e o sedimento foi ressuspensa com 1000µL de PBS (Anexo I, item 1.2) e diluída até 10⁻⁵. As concentrações 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram incubadas em duas placas de Petri cada em meio Oligo (2x) (AFNOR, 1980) modificado por Santos (2015) (Anexo I, item 1.3), e os 900µL restantes foram semeados em BG11 em tubos de ensaio, para serem utilizadas nos experimentos. Posteriores repiques para manutenção da cultura foram realizados com inóculos de 10% do volume total em erlenmeyers.

As culturas de *C. sorokiniana* foram aclimatadas aos efluentes antes do início dos experimentos. Para tanto, subculturas foram realizadas em diluições (10, 25, 50, 75 e 100%) de meio em água destilada estéril e mantidas a 30°C, com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes (100 a 120 µmol.m⁻².s⁻¹), em fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro). Assim que as subculturas se mostraram adaptadas a 10% do meio, observado pela contagem de células, elas foram inoculadas em novo meio contendo 25% do efluente e, assim, sucessivamente, até que as subculturas conseguissem crescer apenas no efluente. Este procedimento foi realizado tanto para o meio de efluente suíno quanto para o efluente de esgoto UASB.

4.1.2 Cultivo das bactérias

Cepas bacterianas produtoras de ácido indol-acético e solubilizadoras de fosfato foram selecionadas tendo como base o trabalho de Santos (2018), que isolou bactérias associadas a cultivos monoalgais da coleção do Laboratório de Biotecnologia de Algas e da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce

(Departamento de Botânica, UFSCar) e pesquisou os fatores de crescimento vegetal presentes nas bactérias isoladas.

As bactérias, pertencentes à biblioteca do laboratório, foram incubadas por dois dias em tubos de ensaio com meio Triptona de Soja (TSB – Oxoid®), com inóculos de 100µL em 5mL de meio de cultura. Foram utilizados três cultivos de bactérias: um consórcio de biofilme (proveniente do fotobiorreator instalado na ETE de São Calos), uma cultura solubilizadora de fosfato e uma cultura produtora de AIA.

4.2 Condições do cultivo em batelada

As bateladas foram realizadas em frascos de 2 litros, com 1 litro de volume de meio de cultura, a, em média, 30°C com fotoperíodo de 12/12 horas (100 a 120 µmol.m⁻².s⁻¹),. Em todas as bateladas foram analisadas cinco amostras:

- Efluente sem microrganismos (EF);
- *C. sorokiniana* (CS);
- *C. sorokiniana* com um consórcio de bactérias de biofilme (BIOF);
- *C. sorokiniana* com bactéria solubilizadora de fosfato (SP);
- *C. sorokiniana* com bactéria produtora de AIA (AIA).

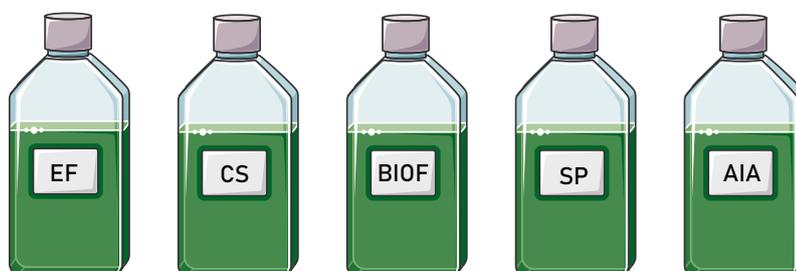


Figura 1. Esquema das cinco amostras analisadas nas bateladas.

A concentração dos inóculos de algas e bactérias em todas as bateladas foi de 10⁵ e 10⁴ cel/ml, respectivamente. Foram realizadas quatro bateladas: duas com efluente de suinocultura e duas com efluente de reator da UASB.

4.2.1 Obtenção do efluente de suinocultura (Bateladas 1 e 2)

O efluente de suinocultura utilizado como meio de cultivo nos experimentos foi fornecido pela Fazenda Santo Inácio de Loyola, localizada em Brotas

(SP). Logo após a coleta, o efluente foi filtrado em gaze para a remoção de sólidos grosseiros. Antes da realização dos co-cultivos em escala de laboratório, o efluente foi autoclavado (121°C por 45 minutos) para que outros organismos presentes na amostra não interferissem nos resultados.

4.2.2 Obtenção do efluente de reator UASB (Bateladas 3 e 4)

O efluente de reator UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) foi obtido de uma estação experimental piloto de tratamento de água negra simulada, localizada na Estação de Tratamento de Esgoto Monjolinho, na cidade de São Carlos (SP). Antes da realização dos co-cultivos, o efluente foi autoclavado (121°C por 45 minutos).

4.3 Quantificação de nutrientes

Para a avaliação da remoção de nutrientes por *C. sorokiniana* foram determinadas as concentrações de nitrogênio total dissolvido (NTd – método de digestão com persulfato em meio alcalino segundo *American Public Health Association* (2017) e leitura com o uso de kits HACH NITRATO TNT – Código 2605345-BR – método do dimetilfenol, de acordo com as instruções do fabricante) e fósforo total dissolvido (PTd – método de digestão com persulfato em meio ácido e leitura pelo método do ácido ascórbico, segundo *American Public Health Association* (2017)).

Também foi realizado o monitoramento de variáveis físico-químicas: pH (pHmetro da marca ION, modelo PHB500) e densidade óptica em 680 nm (espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR5000).

4.4 Indicadores do crescimento das microalgas

4.4.1 Densidade populacional

A densidade populacional (cel/mL), um indicador direto de crescimento, foi obtida pela contagem da *C. sorokiniana* em câmara de Fuchs-Rosenthal. Os valores das contagens em microscópio foram então analisados por meio do cálculo

do seu logaritmo natural para ser possível comparar as amostras em relação ao crescimento.

4.4.2. Fluorescência

A fluorescência (RFU) emitida pelo cultivo quando excitada pela luz de faixa azul do espectro, foi utilizada como um indicador indireto do crescimento. A medida de fluorescência foi determinada em fluorímetro (marca *Turner*, modelo *Trilogy*), por fluorescência *in vivo* das células algais. Esta fluorescência é diretamente relacionada à produção de clorofila *a* em células vegetais, seguindo a seguinte relação: quanto maior a produção dessa clorofila, mais altos os níveis do processo fotossintetizante e, conseqüentemente, maior a fluorescência detectada no dispositivo (SIEFERMANN-HARMS, 1987). Portanto, quanto maior o valor de RFU, em maior nível de crescimento está a cultura. As fluorescências medidas das amostras contendo apenas o meio (efluente ou suíno) foram utilizadas como o “branco” das amostras, tendo seus valores descontados das outras amostras da mesma batelada.

4.4.3 Análise por imagens

Além disso, na última batelada também foi realizada uma análise da concentração celular de microalgas nas amostras e do tamanho celular das mesmas, em parceria com o Prof. Dr. Valdinei Luís Belini, do departamento de Engenharia Elétrica da UFSCar.

A aquisição de imagens microscópicas foi realizada pelo uso de um microscópio *in situ* (SUHR et al., 1995). O instrumento foi construído como parte das atividades de pesquisa do Prof. Dr. Belini, e foi inspirado em uma versão do instrumento construído na *Mannheim University of Applied Sciences*, Mannheim, Alemanha (WIEDEMANN et al., 2011) pelo idealizador da técnica da microscopia *in situ*, a saber, Prof. Dr. Hajo Suhr.

Essencialmente, o instrumento consiste em um microscópio de transmissão em campo claro equipado com uma câmera que captura imagens microscópicas diretamente da suspensão sob análise. Para uma revisão crítica sobre microscopia *in situ*, consulte Belini *et al.* (2013).

Todas as imagens foram obtidas pelo uso de uma objetiva de imersão customizada ($\times 40$, abertura numérica = 0,75) e um sensor CCD comercial (A102f, Basler, Ahrensburg, Germany, 1392×1040 pixels, $6,6 \times 8,8$ mm², tamanho dos pixels $6,45 \times 6,45$ μm^2 , bitmap, 8 bits). As imagens capturas possuem resolução óptica ($\sim 0,5$ μm) comparável à de um microscópio de bancada. Um LED vermelho ($\lambda = 680$ nm) foi utilizado como fonte de iluminação.

Para o monitoramento da densidade e de parâmetros morfológicos da suspensão de algas, 500 imagens microscópicas de cada dia de análise foram capturadas pelo instrumento. O procedimento foi repetido para todos os meios de cultivo utilizados: (i) CS, (ii) AIA, (iii) BIOF, e (iv) SP. Cada imagem foi capturada a uma taxa de um quadro por segundo.

Subsequente ao processo de aquisição de imagens, elas foram processadas e analisadas por um algoritmo de processamento de imagem desenvolvido no MATLAB.

Em uma primeira etapa, um filtro passa-baixa (GONZALEZ e WOODS, 2008) foi aplicado na imagem de entrada para reduzir ruídos aleatórios. Na sequência, um filtro passa-alta foi utilizado para realçar bordas dos objetos. Para realizar a detecção dos objetos nas imagens, estas foram transformadas para uma imagem de gradientes pelo uso de operadores de Sobel (GONZALEZ e WOODS, 2008). Esta transformação atua como um filtro passa altas, aumentando o contraste entre as bordas dos objetos e o fundo da imagem. Na sequência, operações morfológicas (SOILLE, 2003) foram aplicadas na imagem Sobel para melhorar a forma dos objetos detectados.

Uma vez que os objetos são detectados na imagem, uma etapa que envolve a lógica booleana E entre os valores de circularidade (SOLTYS *et al.*, 2005) e de tamanho classifica os objetos detectados. Objetos cujos valores de circularidade e de tamanho estejam compreendidos dentro da faixa de valores determinada pelo algoritmo são classificados como algas. Objetos que possuem valores acima ou abaixo da faixa de interesse são automaticamente descartados pelo algoritmo. A quantidade de objetos classificados neste procedimento é calculada e armazenada em um arquivo.

4.5 Análise Estatística

Os testes ANOVA, de Tukey, normalidade, homocedasticidade e independência dos dados foram realizados com o software livre R (*R DEVELOPMENT CORE TEAM*, 2008), no pacote R Commander (FOX e BOUCHET-VALAT, 2017), utilizando como padrão a significância de 5% nas análises. Os gráficos foram gerados no Microsoft Office Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Batelada 1

A primeira batelada (Figura 2) foi realizada utilizando efluente de suinocultura como meio de cultivo, com aeração constante e fotoperíodo de 12/12 horas.



Figura 2. Foto das amostras da batelada 1 ao início do experimento. Da esquerda para a direita, as amostras são: AIA, CS, EF, BIOF e SP.

Durante todo o cultivo foi acompanhado o pH e a absorvância do meio. O pH de todas as amostras variou de forma semelhante (Figura 3), indo de 8,2 ($\pm 0,1$) para 8,9 ($\pm 0,4$). A única exceção foi a amostra controle (EF), que apresentou pH final 8,2. Durante o metabolismo autotrófico as microalgas retiram CO_2 do meio, o que o torna mais alcalino, justificando o aumento do pH e a diferença entre as amostras com e sem microrganismos.

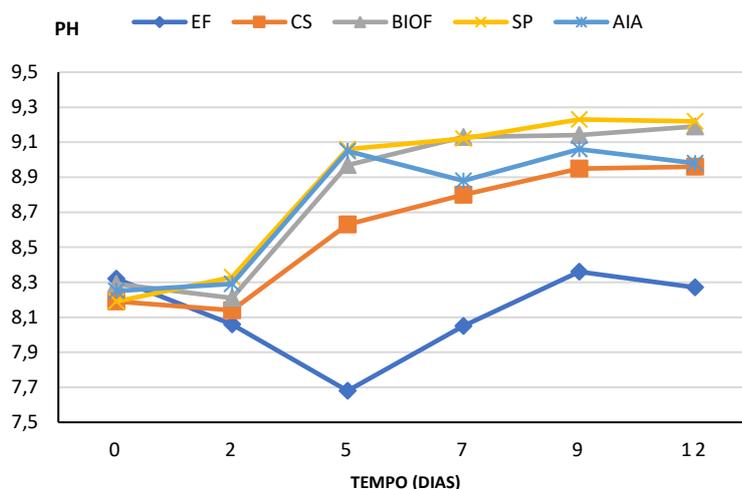


Figura 3. Valores de pH das amostras ao longo do cultivo da batelada 1.

Já a absorbância a 680nm refere-se à quantidade de clorofila, portanto serve como indicador indireto de crescimento. Todas as amostras apresentaram aumento nos valores (Figura 4), variando de 1,2 ($\pm 0,1$) para 2,1 ($\pm 0,2$), indicando crescimento celular.

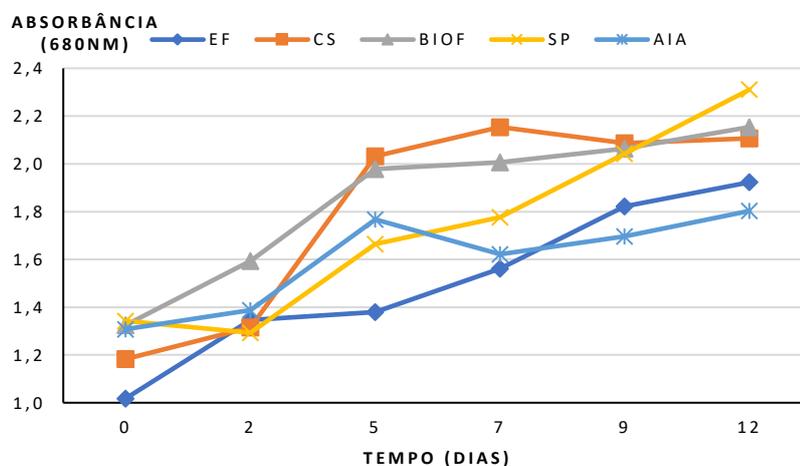


Figura 4. Valores de absorbância das amostras ao longo do cultivo da batelada 1.

Foram quantificados nitrogênio e fósforo totais dissolvidos ao início e ao final do cultivo, a 0 e 12 dias, respectivamente (Figura 5). As concentrações finais de fósforo foram semelhantes em todas as amostras, com quase a mesma quantidade do nutriente ao início e fim. Porém em relação ao nitrogênio dissolvido, a amostra SP apresentou o menor índice do nutriente disponível ao final do cultivo, com remoção de 43% da quantidade total. A variação das quantidades iniciais de nutrientes deve-se ao

fato de que este cultivo não foi realizado em duplicata ou triplicata, portanto tais valores estariam dentro do desvio padrão de medição.

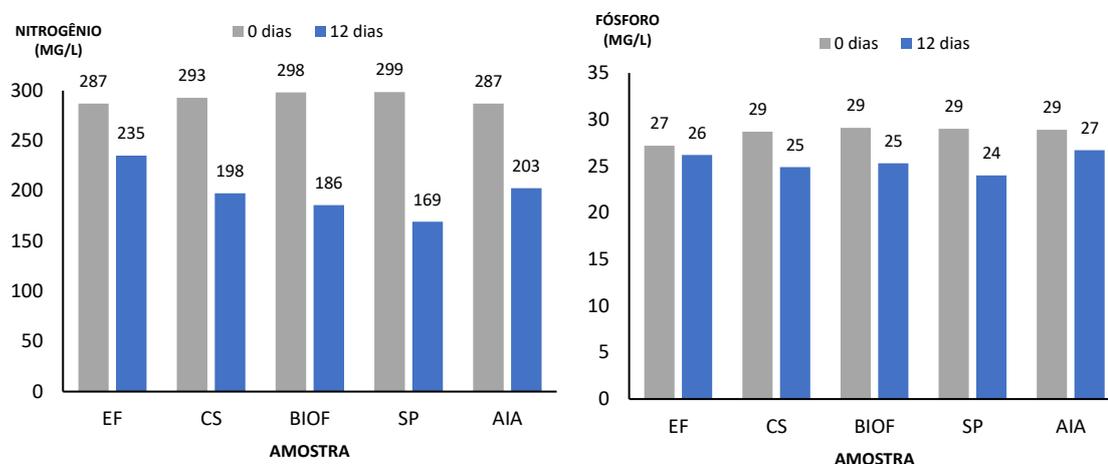


Figura 5. Dados de nitrogênio e fósforo totais dissolvidos nas amostras em 0 dias e 12 dias do cultivo da batelada 1.

Todas as amostras apresentaram crescimento da densidade populacional semelhantes, porém a amostra com alga e bactéria solubilizadora de fosfato (SP) apresentou valores superiores aos das outras amostras, com um aumento entre os dias 9 e 12 de cultivo (Figura 6). Em números de células por mililitro (cel/ml), a amostra SP se destacou com a maior concentração atingida na contagem, no décimo segundo dia, com $4,8 \cdot 10^7$ cel/ml, seguida das amostras CS, BIOF e AIA, que atingiu $1,7 \cdot 10^7$ cel/ml (Tabela 1). Os resultados de contagem diferentes de zero obtidos nas amostras sem microrganismos se devem devido à alta quantidade de detritos e partículas presentes no meio.

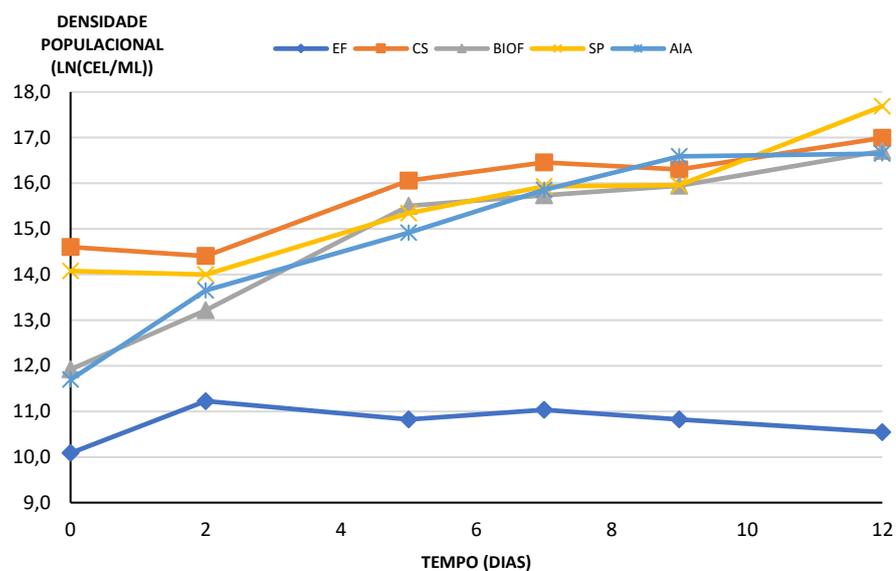


Figura 6. Variação da densidade populacional na batelada 1.

Tabela 1. Relação entre a concentração de células por ml de cada amostra da batelada 1 no 12º dia de cultivo.

Amostra	Concentração (cel/ml)
EF	$3,8 \cdot 10^4$
CS	$2,4 \cdot 10^7$
BIOF	$1,8 \cdot 10^7$
SP	$4,8 \cdot 10^7$
AIA	$1,7 \cdot 10^7$

De acordo com os dados de fluorescência (Figura 7), também é possível inferir que o crescimento de todas as amostras foi semelhante. Porém, na análise indireta, a amostra sem inóculo de bactéria (CS), apresentou maiores valores e conseqüentemente maior crescimento, seguida pela SP, AIA e BIOF.

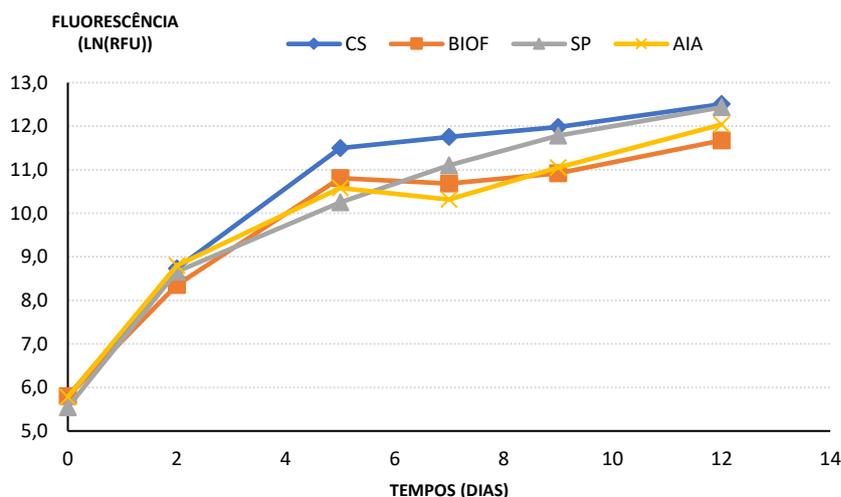


Figura 7. Variação da fluorescência em função do tempo durante a batelada 1.

Tendo em mente uma curva de crescimento microbiano (Figura 8), onde os microrganismos, após adaptação, crescem em fase exponencial e depois atingem uma fase estacionária antes de iniciar a fase de morte celular, os valores observados na Figura 7, por exemplo, indicam que as microalgas poderiam estar se aproximando da fase estacionária ao final do cultivo.

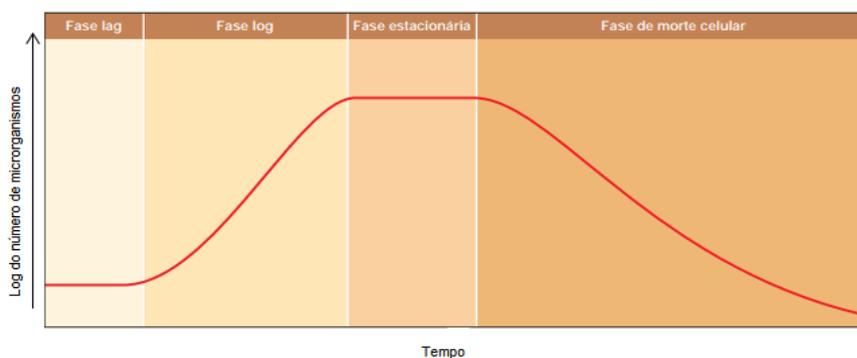


Figura 8. Curva de crescimento microbiano em função do tempo de cultivo. Adaptado de Tortora, capítulo 6 (2012).

5.2 Batelada 2

Na segunda batelada foi utilizado novamente o efluente de suinocultura como meio de cultivo, porém desta vez foi também avaliada a influência da aeração sob o cultivo. Para isto, foram preparadas duas de cada amostra, uma com aeração constante e uma sem, sob as mesmas condições do cultivo anterior.

Medições de absorvância e pH foram realizadas ao longo do cultivo. A absorvância aumentou durante o cultivo na maioria das amostras, havendo maior variação entre as amostras com aeração (Figura 9). Isto pode ter ocorrido porque no início desta batelada houveram vazamento nas amostras com aeração, portanto os volumes finais ficaram diferentes. A absorvância média das amostras sem aeração foi de 2,3 para 2,6 ($\pm 0,2$), e com aeração de permaneceu em 2,5 ($\pm 0,1$).

Além disso, houve um resultado inesperado da amostra BIOF, onde a absorvância medida foi menor do que as demais amostras. A média do pH das amostras sem aeração no início e no final do cultivo foi igual a 8,6 ($\pm 0,2$), enquanto nas amostras com aeração foi de 8,7 ($\pm 0,2$) para 8,6 ($\pm 0,4$) (Figura 10).

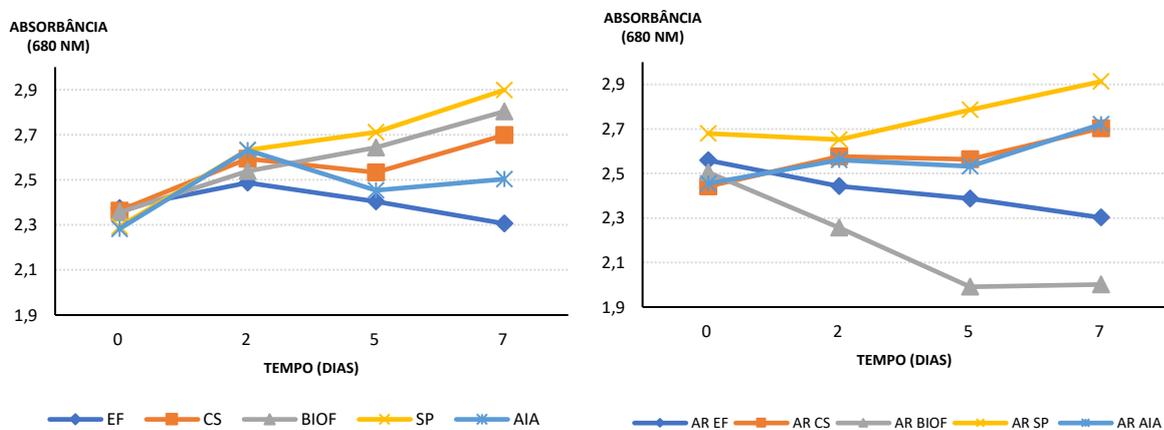


Figura 9. Valores de absorvância obtidos durante o cultivo da batelada 2 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

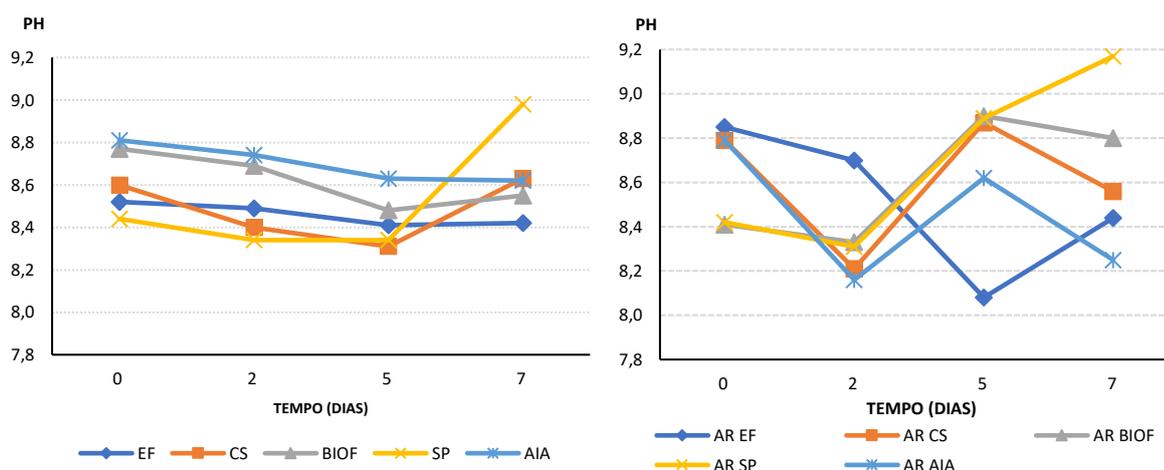


Figura 10. Valores de pH medidos durante o cultivo da batelada 2 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Analisando apenas o crescimento direto da *C. sorokiniana* (Figura 11), ambos os ensaios (com e sem aeração) apresentaram resultados semelhantes, onde as amostras com aeração tiveram um desempenho pouco maior. Porém, quando analisados os números das concentrações em cel/mL, de forma geral, as amostras com aeração atingiram valores maiores.

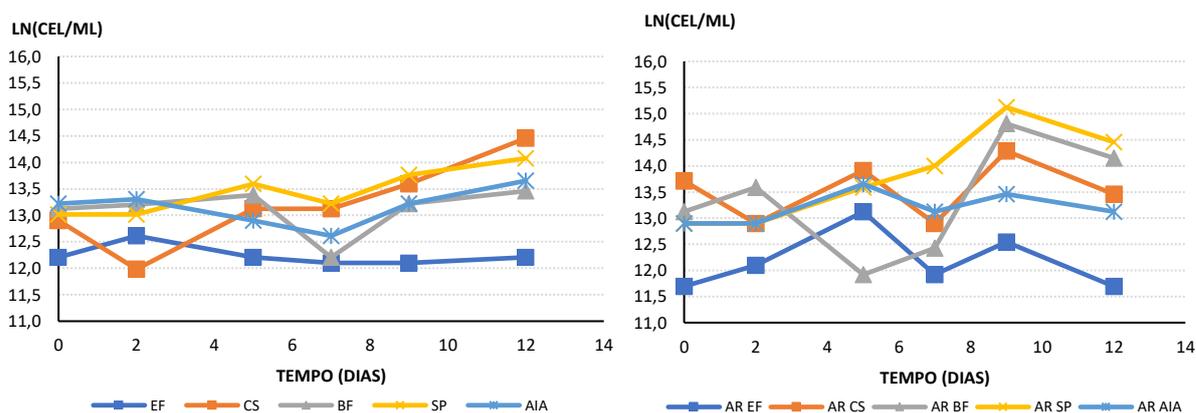


Figura 11. Variação da densidade populacional em função do tempo na batelada 2 das amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Das amostras sem aeração, a maior concentração atingida foi da amostra CS, com $1,9 \cdot 10^6$ cel/mL no último dia de cultivo. Já das amostras com aeração a maior concentração foi a da amostra SP com $3,7 \cdot 10^6$ no nono dia de cultivo (Tabela 2). Portanto, as amostras com aeração não só atingiram uma densidade populacional maior, mas também em menor tempo.

Tabela 2. Relação entre a concentração de células por mililitro das amostras da batelada 2 no décimo segundo dia, último dia de cultivo.

Amostra	Concentração (cel/mL)	Amostra	Concentração (cel/mL)
EF	$2,0 \cdot 10^5$	AR EF	$1,2 \cdot 10^5$
CS	$1,9 \cdot 10^6$	AR CS	$7,0 \cdot 10^5$
BIOF	$7,0 \cdot 10^5$	AR BIOF	$1,4 \cdot 10^6$
SP	$1,3 \cdot 10^6$	AR SP	$1,9 \cdot 10^6$
AIA	$8,5 \cdot 10^5$	AR AIA	$5,0 \cdot 10^5$

Já em relação ao crescimento indireto, a fluorescência das amostras (Figura 12), é possível observar uma diferença significativa no crescimento, com

valores maiores para as amostras com aeração . Os valores de fluorescência próximos de zero representam amostras onde o RFU medido estava muito próximo dos valores da amostra controle (EF), que é correspondente ao “branco” da análise.

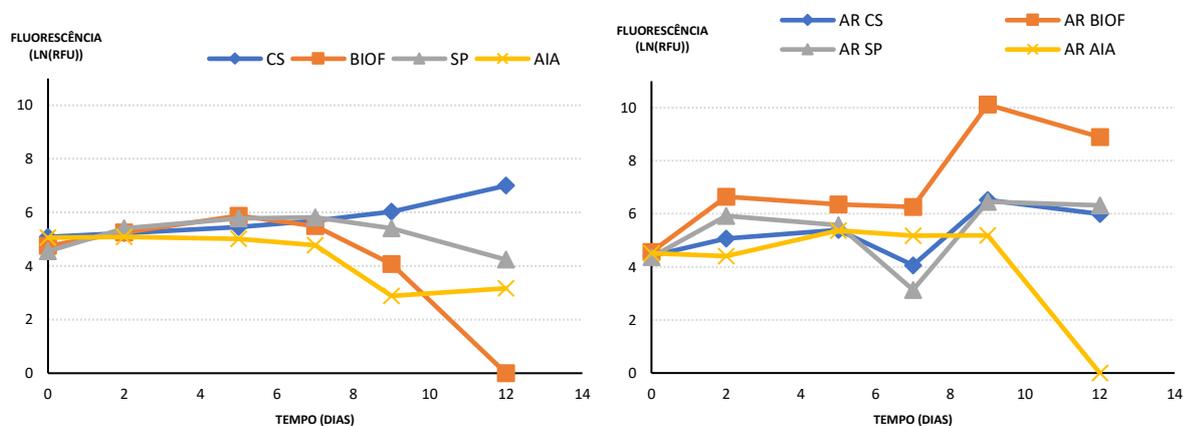


Figura 12. Variação da fluorescência em função do tempo para as amostras da batelada 2. Na esquerda estão representadas as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração.

A grande variação dos valores tanto das densidades populacionais como fluorescências pode ter ocorrido devido ao fato das amostras não terem sido realizadas em duplicata, não havendo, assim, uma margem de erro ou desvio padrão.

Em comparação com a literatura, estudos demonstram que a aeração auxilia no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos no cultivo (HAMEED, 2007). Porém, os valores obtidos nestas duas bateladas (1 e 2) ainda são baixos quando comparados com os resultados outras pesquisas, como é possível observar na Tabela 3.

Tabela 3. Dados da literatura em relação aos microrganismos, meio de cultivo utilizados e concentração celular final alcançada.

Artigo	Microrganismos	Meio de Cultivo	Concentração celular final (cel/mL)
ASMARE et al. (2014)	<i>C. vulgaris</i> e <i>S. dimorphus</i>	Efluente da indústria de laticínios	$1,5 \cdot 10^7$
GODOS et al. (2010)	Consórcio envolvendo <i>C. sorokiniana</i> *	Efluente de esgoto	$8,5 \cdot 10^7$
HERNANDEZ et al. (2009)	<i>C. vulgaris</i> e <i>B. pulmilus</i>	<i>synthetic growth medium</i>	$8,0 \cdot 10^6$
DE-BASHAN et al. (2004)	<i>C. sorokiniana</i> e <i>A. brasiliense</i>	Efluente de esgoto	$4,0 \cdot 10^6$

*Composição do consórcio não fornecida.

O baixo crescimento pode ter decorrido do fato do meio de cultura ser escuro e turvo, o que dificulta a difusão da luz de forma homogênea em todo o volume de cultivo, e é amplamente estudada a influência da intensidade da luz no crescimento algal (HO et al, 2012; JIA e YUAN, 2018). Então, para as próximas bateladas foi utilizado como meio de cultura o efluente de reator UASB, que é visivelmente menos turvo e assim facilitaria o desenvolvimento das microalgas.

5.3 Batelada 3

Na batelada 3 foi utilizado como meio de cultivo o efluente de reator UASB e novamente foi avaliada a influência da aeração sob o cultivo. Assim, foram preparadas duas amostras de cada, uma com e uma sem aeração, como ilustra a Figura 13.



Figura 13. Foto das amostras da batelada 3 ao início do experimento. À frente estão as amostras sem aeração e ao fundo as amostras com aeração.

Foram acompanhados, durante o cultivo, a absorbância e o pH de todas as amostras. Os valores medidos de absorbância, de forma geral, foram menores para as amostras sem aeração em relação àquelas com aeração (Figura 14). A média da absorbância das amostras sem aeração foi igual a $0,3 (\pm 0,1)$, enquanto nas amostras com aeração, variou de 0,3 para 0,7 ($\pm 0,4$). No item 5.2.2 é possível observar que a absorbância das amostras em efluente de suinocultura atingiu valores acima de 2, o que demonstra que este meio de cultivo é menos turvo e conseqüentemente favorece a difusão da luz de forma mais homogênea no meio, que é um fator de importante para o crescimento das microalgas (GONZÁLEZ-CAMEJO et al., 2018).

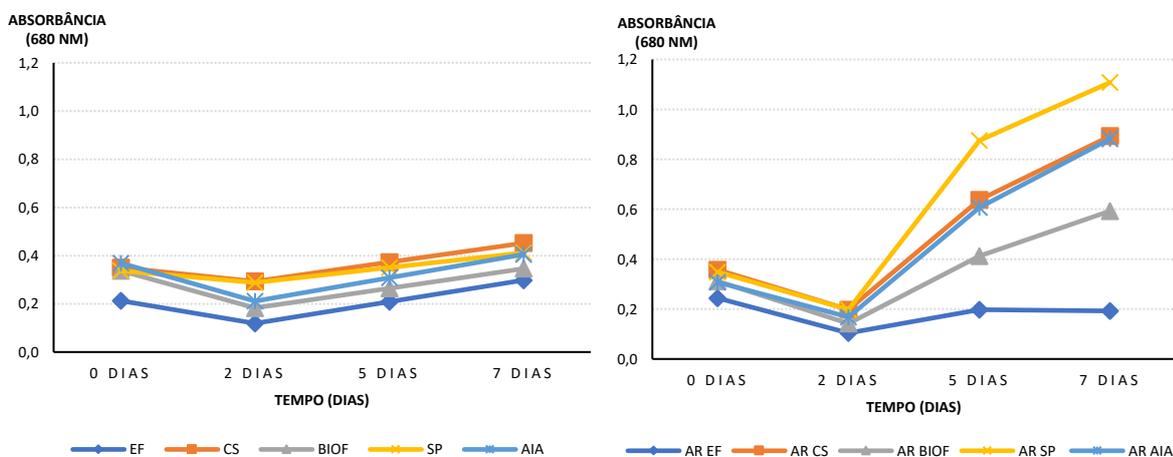


Figura 14. Valores de absorbância obtidos durante o cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Nas amostras sem aeração a média dos valores de pH variou de 9,6 para 9,4 ($\pm 0,1$). Já nas amostras com aeração, a média foi de 9,5 ($\pm 0,1$) para 9,7 ($\pm 0,5$) (Figura 15).

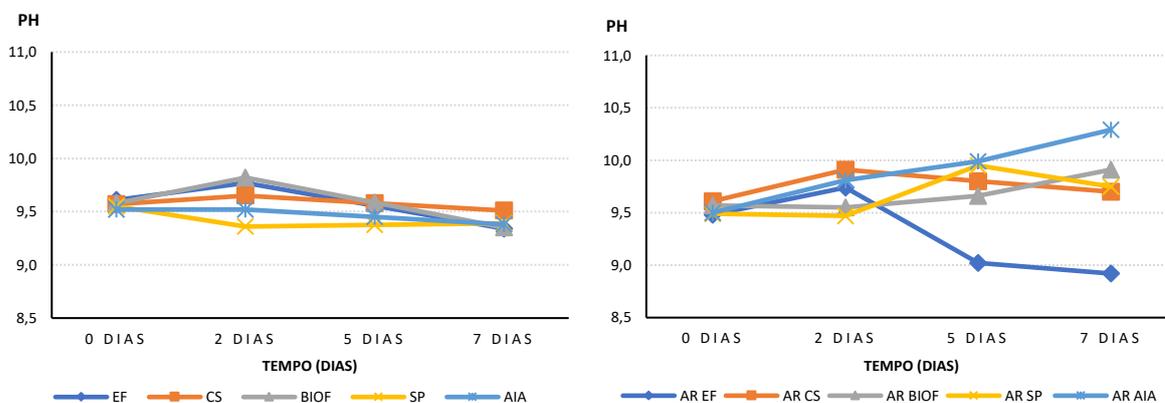


Figura 15. Valores de pH obtidos durante o cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Também foram medidas as concentrações de nitrogênio e fósforo totais dissolvidos nas amostras ao início e final do cultivo (Figura 16). Para ambos os nutrientes as amostras com aeração apresentaram concentrações finais menores, com destaque das amostras SP e AIA. Em relação ao nitrogênio dissolvido, a amostra AR SP se sobressaiu, com um decaimento de 35% da concentração, seguida pela amostra AR AIA com 31%. Em contrapartida, nas amostras sem aeração o maior decaimento observado foi de 12% em SP.

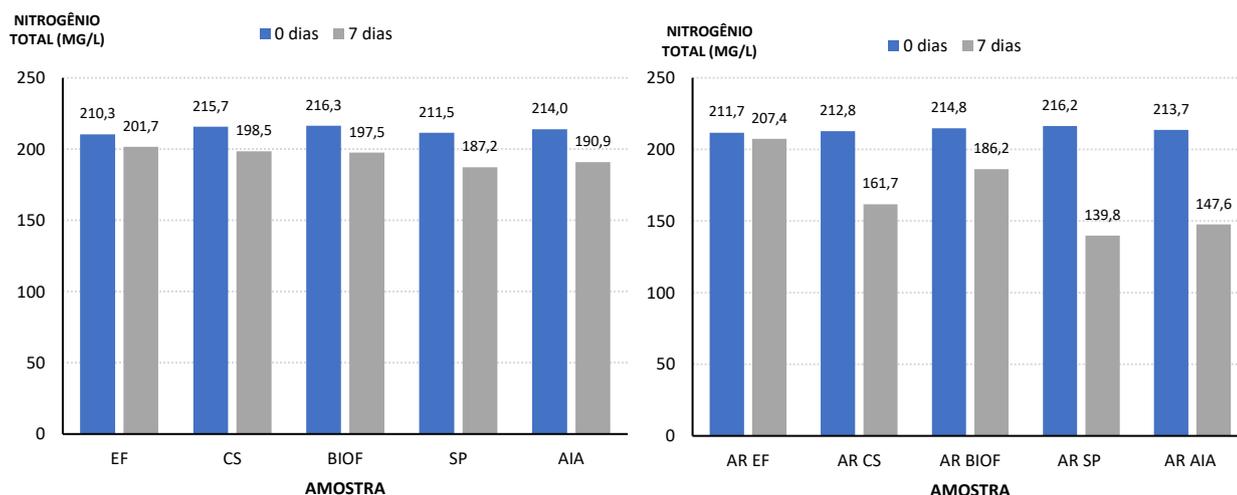


Figura 16. Valores de nitrogênio total dissolvido em 0 e 7 dias de cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Em relação ao fósforo total dissolvido, a amostra AR SP se sobressaiu com 31% menos nutriente ao final do cultivo, seguida pelas amostras AR AIA e AR CS, com 25% cada. Nas amostras sem aeração, CS apresentou maior decaimento da quantidade de fósforo dissolvido, porém com apenas 8% a menos do que no início (Figura 17).

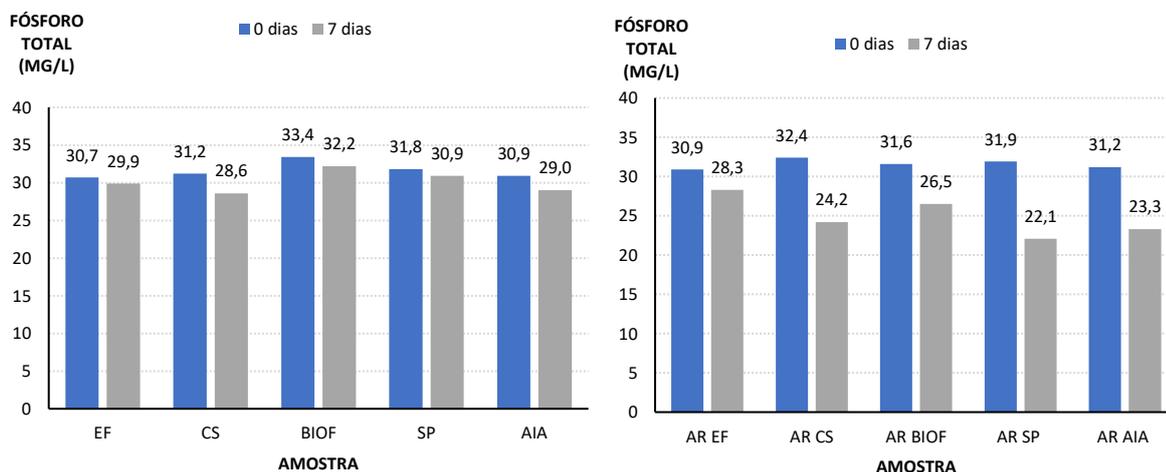


Figura 17. Valores de fósforo total dissolvido em 0 e 7 dias do cultivo da batelada 3 para as amostras sem aeração, à esquerda, e com aeração, à direita.

Os dados de densidade populacional demonstram que o crescimento foi maior nas amostras com aeração em relação àquelas sem aeração, e maior também

no efluente reator UASB do que no efluente de suinocultura (Figura 18). Há estudos discutindo a dificuldade do crescimento de microalgas em efluente de suinocultura não diluído, devido à provável inibição pelo excesso de constituintes (WANG et al., 2016), e o mesmo resultado foi encontrado neste estudo. Das amostras sem aeração, a com maior concentração foi a SP com $1,4 \cdot 10^6$ cel/mL, enquanto das amostras com aeração foi a CS com $1,8 \cdot 10^7$ cel/mL (Tabela 4).

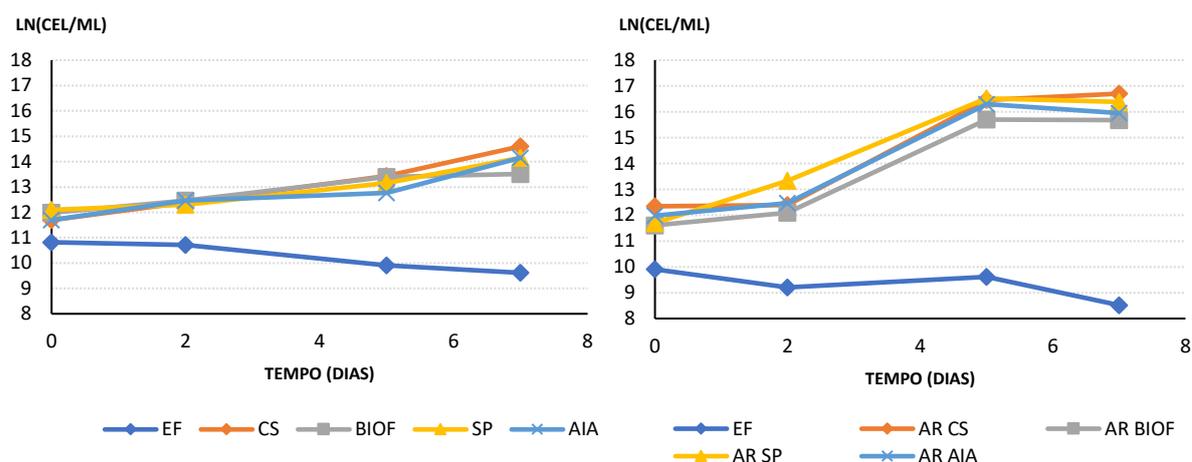


Figura 18. Variação da densidade populacional para as amostras da batelada 3. Na esquerda estão as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração.

Tabela 4. Relação entre a concentração de células por mililitro de cada amostra da batelada 3 no último dia de cultivo, sétimo dia.

Amostra	Concentração (cel/mL)	Amostra	Concentração (cel/mL)
EF	$1,5 \cdot 10^4$	AR EF	$5,0 \cdot 10^3$
CS	$2,2 \cdot 10^6$	AR CS	$1,8 \cdot 10^7$
BIOF	$7,4 \cdot 10^5$	AR BIOF	$6,5 \cdot 10^6$
SP	$1,4 \cdot 10^6$	AR SP	$1,3 \cdot 10^7$
AIA	$1,4 \cdot 10^6$	AR AIA	$8,5 \cdot 10^6$

Apesar das concentrações maiores das amostras com aeração, é possível perceber que a amostra com maiores valores de densidade populacional e concentração final foi a CS, ou seja, microalga sem a presença de bactéria. Esta amostra atingiu, como já foi citado, $1,8 \cdot 10^7$ cel/mL no sétimo dia de cultivo, porém a amostra SP obteve a concentração mais próxima, $1,5 \cdot 10^7$ cel/mL, em cinco dias de cultivo, havendo um decaimento para $1,3 \cdot 10^7$ ao final da batelada.

Os dados de fluorescência implicam nos mesmos resultados dos dados de densidade populacional, indicando as amostras com aeração com maior desempenho e maior crescimento. Além disso, as amostras aeradas no sétimo dia de cultivo apresentaram valores semelhantes tanto na fluorescência quanto na densidade populacional (Figura 19).

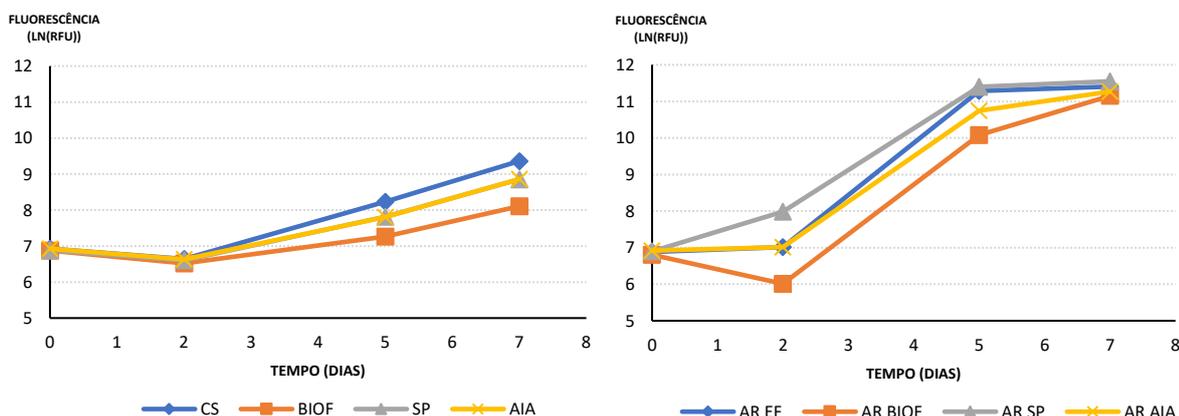


Figura 19. Variação da fluorescência em função do tempo para as amostras da batelada 3. Na esquerda estão representadas as amostras sem aeração e na direita as amostras com aeração.

Pelos gráficos é possível perceber que os valores de fluorescência foram maiores para as amostras com aeração, e da mesma forma não houve um destaque das amostras com bactérias em relação à amostra apenas com microalga (CS). Logo, o co-cultivo com estas bactérias em específico não se mostrou vantajoso para o desenvolvimento das microalgas do ponto de vista de crescimento celular.

Pelas imagens do sétimo dia de cultivo (Figura 20), é perceptível a olho nu a diferença significativa entre as amostras com e sem aeração, onde as primeiras (ao fundo) apresentaram coloração verde mais forte que as outras, indicando maior concentração de microalgas.

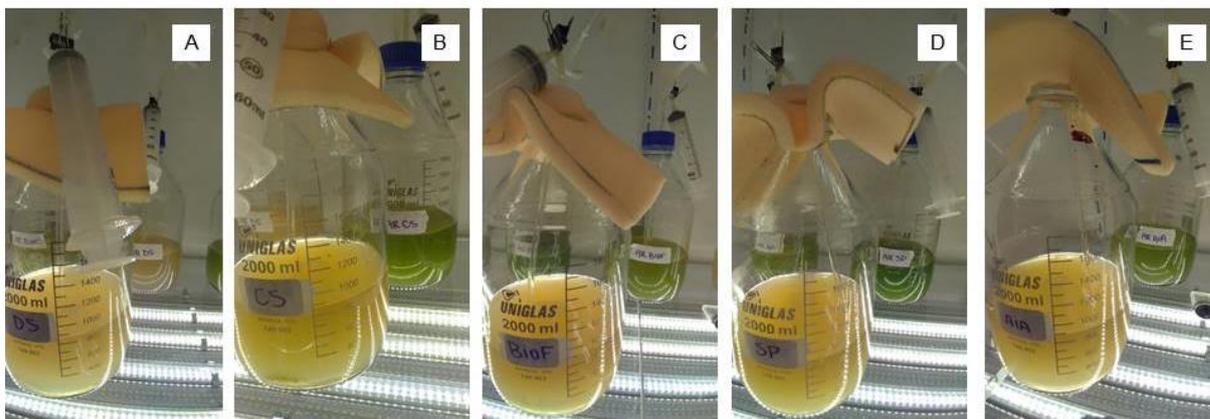


Figura 20. Fotos das amostras da batelada 3 no sétimo dia de cultivo, com as amostras sem aeração à frente e com aeração ao fundo. A: amostras EF; B: amostras CS; C: amostras BIOF; D: amostras SP; E: amostras AIA.

Analisando estes gráficos e tendo em mente a curva padrão de crescimento microbiano já citada anteriormente (Figura 8), é possível inferir que estas amostras ainda não haviam atingido a fase estacionária em sete dias de cultivo, pois ainda se assemelhavam à região de crescimento exponencial. Portanto foi decidido realizar mais uma batelada, onde seria analisada a influência do tempo de cultivo no crescimento algal durante o experimento.

5.4 Batelada 4

Nesta última batelada foi utilizado o efluente de reator UASB como meio de cultura, onde todas as amostras foram mantidas com aeração constante e realizadas em duplicata. Para avaliar a influência do tempo de cultivo sobre as taxas de crescimento, o cultivo foi mantido por 12 dias.

Do início do cultivo até o sétimo dia foram medidos os valores de absorbância e pH das amostras. A absorbância média das amostras foi de de 0,3 para 0,8 ($\pm 0,3$), como mostra a Figura 21, com valores da amostra EF menores que das demais amostras.

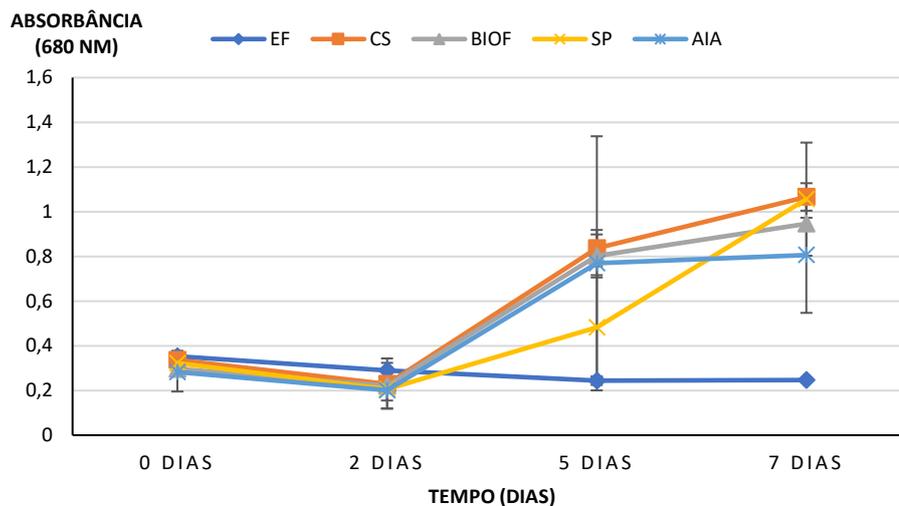


Figura 21. Valores de absorbância obtidos até o sétimo dia de cultivo da batelada 4.

Já a média do pH foi de 9,4 para 9,1 ($\pm 0,2$), sendo que a amostra EF, obteve valores menores que as demais amostras por todo o cultivo (Figura 22). Esta diferença da amostra EF, sem inóculo, em relação às outras é um indicativo da influência da atividade dos microrganismos na variação do pH e da absorbância.

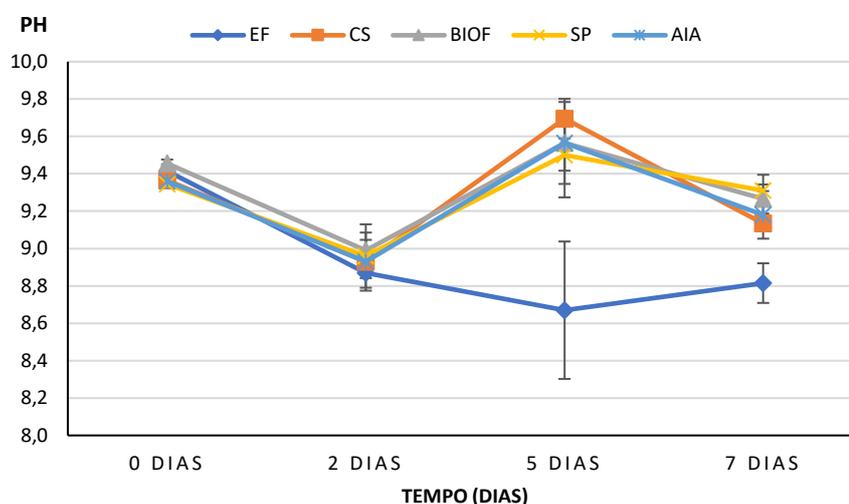


Figura 22. Valores de pH obtidos até o sétimo dia de cultivo da batelada 4.

Também foram medidas as quantidades de nitrogênio e fósforo totais dissolvidos ao início e ao sétimo dia de cultivo (Figura 23). Em relação ao nitrogênio total dissolvido, a amostra SP apresentou o maior decaimento, com redução de 79% da quantidade inicial, seguida da amostra CS com redução de 74%. O mesmo

aconteceu para o fósforo dissolvido, onde a amostra SP apresentou decaimento de 84%, 13,5% mais eficiente que a amostra CS, com 74% de decaimento.

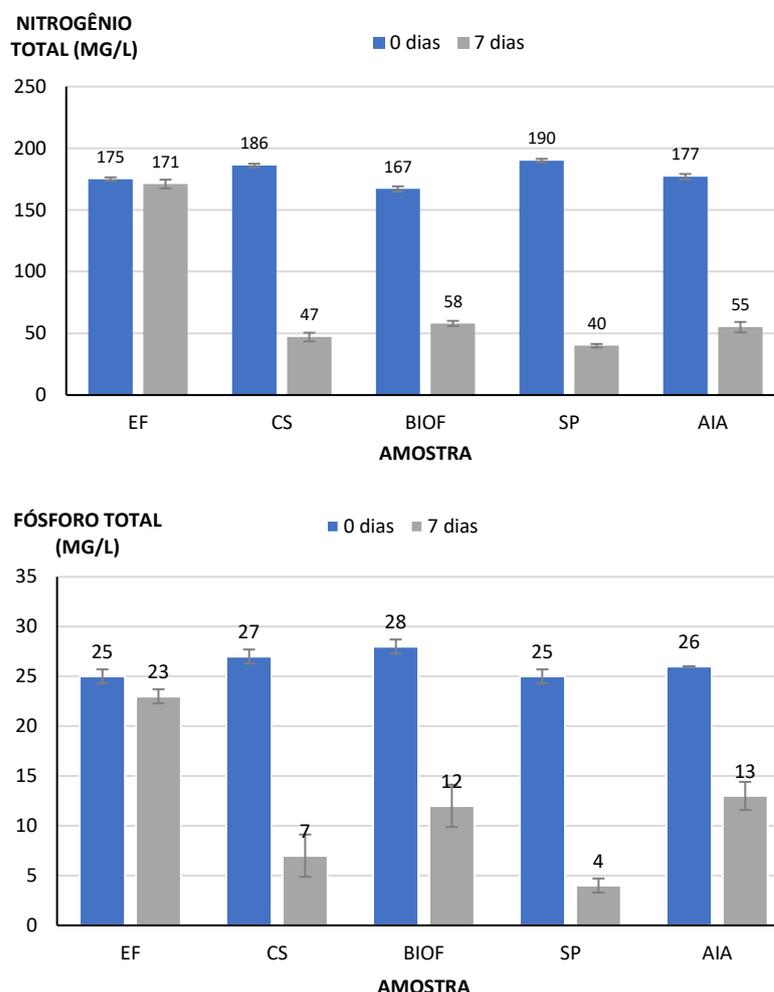


Figura 23. Valores de nitrogênio e fósforo total dissolvido em 0 e 7 dias de cultivo da batelada 4.

Quando comparados com os valores encontrados na literatura (Tabela 5), os dados obtidos de remoção de nutrientes desta batelada são os mais próximos do resultado esperado. Há estudos em que é atingida mais de 90% da remoção de nutrientes, porém utilizando outros microrganismos e em condições de cultivo diferentes. Além disso, o crescimento pode ser inibido quando nitrogênio ou fósforo estão presentes em quantidades limitantes (ABINANDAN et al., 2018), portanto conforme os mesmos eram removidos do meio cultivo e não eram repostos, o crescimento das microalgas pode ter sido inibido, o que consequentemente impediria a remoção da quantidade restante de nutrientes. Deve-se ressaltar, também, que a

maioria dos estudos obteve resultados significativamente melhores para consórcios de bactérias e microalgas quando comparados com os tratamentos sem bactérias.

Tabela 5. Taxas de remoção de nitrogênio e fósforo obtidas em outros estudos.

Microrganismos	Meio de cultivo	Tempo (dias)	Remoção de nitrogênio	Remoção de fósforo	Referência
<i>Chlamydomonas subcaudata</i> , <i>Anabaena sp.</i> e <i>Nitzschia sp.</i>	Efluente de matadouro	115	>70%	>70%	HERNÁNDEZ et al. (2016)
<i>C. vulgaris</i> e <i>B. licheniformis</i>	Efluente sintético	6	78%	92%	LIANG et al., 2013)
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Efluente de fazenda de laticínios	14	>98%	>98%	HENA et al., 2015)
<i>Chlorella sorokiniana</i> e <i>Chlorococcum sp.</i>	Água negra (efluente de banheiro)	8	50%	80%	SILVA et al. (2019)
<i>C. vulgaris</i> e <i>B. licheniformis</i>	Efluente sintético	10	90%	80%	Ji et al. (2018)

Liang et al. (2013) estudou a influência do pH na remoção de nutrientes e constatou que valores de pH mais neutros favoreceram o processo, no caso estudado para o consórcio de *C. vulgaris* e *B. licheniformis*. Além disso, estudos como Ji et al., (2018) e Silva et al., (2019), por exemplo, obtiveram bons índices de remoção de nitrogênio e fósforo com pH controlado em 7,4 e 8, respectivamente. Como neste estudo o pH foi apenas monitorado e não controlado, este poderia ser um fator de influência para alterar a remoção de nutrientes do meio de cultivo.

A remoção de nutrientes pode ser baixa devido à luz limitada como consequência do seu impacto na respiração, e é mais eficiente em casos de ciclos diurnos do que em casos sob iluminação constante, e ao mesmo tempo intensidade luminosa muito alta pode causar foto-inibição (ABINANDAN et al., 2018). Portanto, a intensidade da luz também é um fator que influencia a remoção de nutrientes e o crescimento microalgal durante o cultivo, visto que (SILVA et al., 2019) também constatou que o aumento da intensidade luminosa aumentou a produtividade do sistema.

Já em relação ao crescimento (Figura 24 e Tabela 6), comparando os dados obtidos ao sétimo e décimo segundo dias de cultivo, a densidade populacional

teve, em média, um crescimento de 46%, e a fluorescência um crescimento médio de 43%.

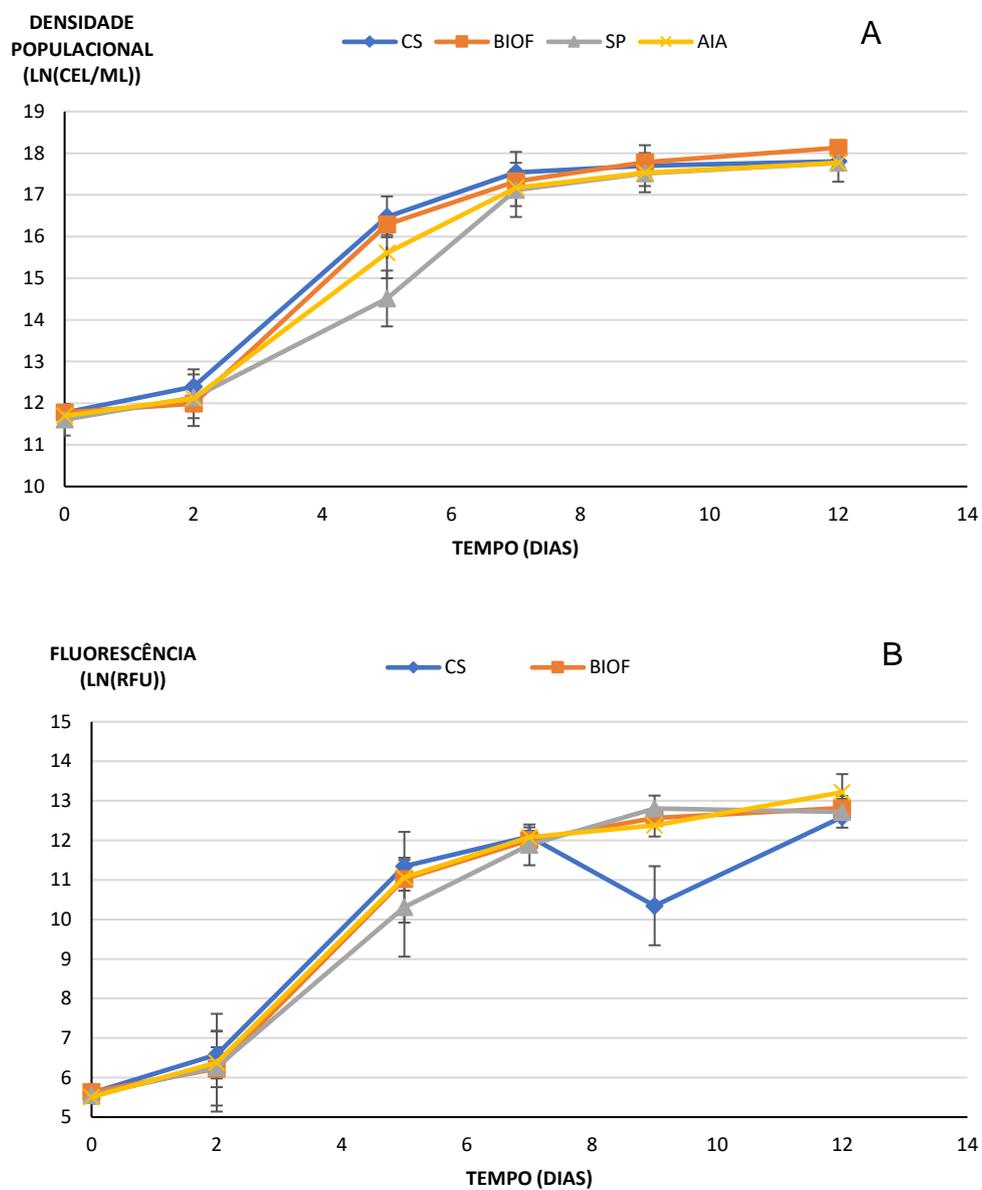


Figura 24. Crescimento da batelada 4. A: Variação da densidade populacional. B: Variação da fluorescência.

Tabela 6. Relação entre a média da concentração de células por mililitro de cada amostra da batelada 4 no sétimo e no décimo segundo dias de cultivo.

Amostra	Concentração (cel/mL) - 7º dia	Concentração (cel/mL) - 12º dia
EF	$7,5 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$
CS	$4,2 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$
BIOF	$3,7 \cdot 10^7$	$7,5 \cdot 10^7$
SP	$2,8 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^7$
AIA	$3,0 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$

Quando comparamos o tempo de cultivo com os dados presentes na literatura, o mais comum é a utilização de 7 dias de experimento, como ilustra a Tabela 7. Portanto é perceptível que os resultados obtidos condizem com outros estudos já realizados.

Tabela 7. Comparação entre tempo de duração e resultados de concentração celular final das bateladas de diferentes artigos.

Artigo	Microorganismos	Tempo de Cultivo	Concentração celular final (cel/mL)
MUJTABA, et al. (2016)	<i>C. vulgaris</i> e <i>P. putida</i>	8 dias	- *
MA et al., (2014)	<i>C. vulgaris</i> e bactérias do esgoto	7 dias	- *
ASMARE et al. (2014)	<i>C. vulgaris</i> e <i>S. dimorphus</i>	7 dias	$1,5 \cdot 10^7$
GODOS et al. (2010)	Consórcio com <i>C. sorokiniana</i>	12 – 20 dias	$8,5 \cdot 10^7$
HERNANDEZ et al. (2009)	<i>C. vulgaris</i> e <i>B. pulmilus</i>	4 dias	$8,0 \cdot 10^6$
DE-BASHAN et al. (2004)	<i>C. sorokiniana</i> e <i>A. brasiliense</i>	7 dias	$4,0 \cdot 10^6$
DE-BASHAN et al. (2002)	<i>C. vulgaris</i> e <i>A. brasiliense</i>	6 dias	$4,0 \cdot 10^6$

*Concentração final não informada no artigo.

Para validar a influência do tempo de cultivo no crescimento microbiano foi realizado um teste ANOVA comparando os valores obtidos de cel/mL para 5, 7, 9

e 12 dias de cultivo de cada amostra e gerados gráficos do Teste de Tukey. Não houve violações graves às suposições do modelo e foi utilizado um intervalo de confiança de 95%.

O Teste de Tukey compara as médias dos dados uma a uma e retorna se são estatisticamente diferentes ou não de acordo com o intervalo de confiança. Nos gráficos, os intervalos que são cortados pela linha pontilhada do zero são aqueles estatisticamente iguais, como é possível observar na Figura 25. Analisando o caso CS (Figura 26A), as comparações CS5 – CS12, CS7 – CS5 e CS9 – CS5 não passam pela linha, portanto são estatisticamente diferentes, ou seja, a média da contagem do quinto dia (CS5) difere das médias observadas no 7º, 9º e 12º dias (CS7, CS9 e CS12, respectivamente). Esta análise indica que há uma diferença estatística entre o 5º e o 7º dia, porém não entre 7º e 12º dias de cultivo, portanto não haveria necessidade de manter o cultivo além do 7º dia em relação aos resultados de contagem de células.

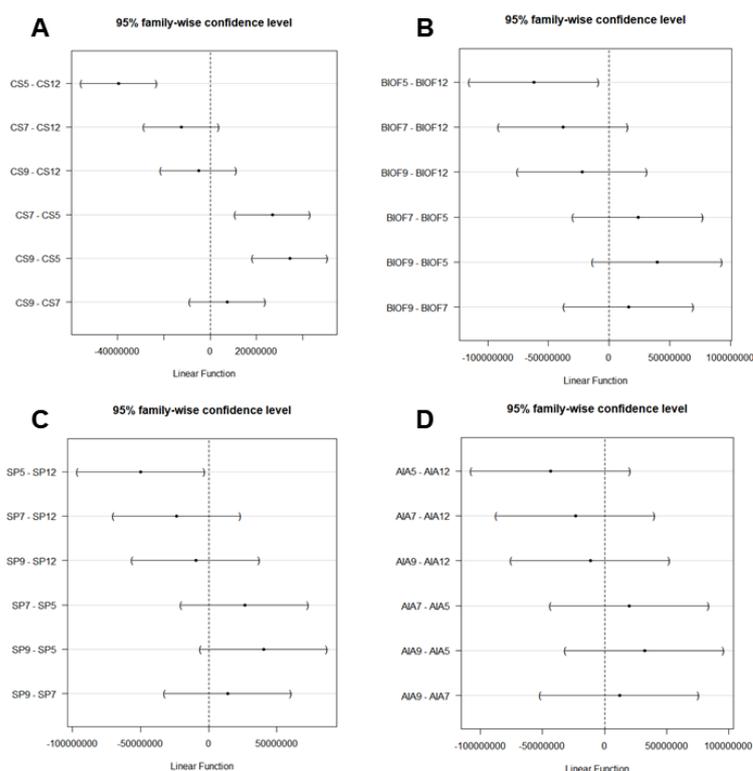


Figura 25. Resultados obtidos para o Teste de Tukey com a realização do ANOVA de um fator com os dados de 5, 7, 9 e 12 dias de cultivo da batelada 4. (A) amostras CS; (B) amostras BIOF; (C) amostras SP e (D) amostras AIA.

Para as amostras BIOF e SP houve divergência entre as médias do 5º e 12º dias, não havendo divergências entre os outros pontos (CS7, CS9 e CS12). Nestes casos, como os intervalos nos gráficos estão próximos do zero, ou seja, a divergência é pequena, é possível assumir que as médias são similares estatisticamente. Por fim, para a amostra AIA nenhuma comparação resultou em divergência portanto do 5º ao último dia de cultivo as médias de contagem celular são estatisticamente iguais.

Além disso, foi realizada uma análise adicional de concentração celular das amostras e tamanho celular, a partir de fotos tiradas de uma mistura das duas amostras da duplicata.

Na amostra CS, entre o sétimo e o nono dias de cultivo houve o maior aumento de tamanho das células, indo de 231 para 277 pixels (Figura 26). A curva mostra ainda que o padrão de crescimento das células se assemelha ao padrão de crescimento exponencial, portanto este tempo de cultivo ainda teria sido insuficiente para que fosse atingida a fase estacionária do crescimento microbiano. Na Figura 27 é possível observar algumas das imagens obtidas da amostra CS.

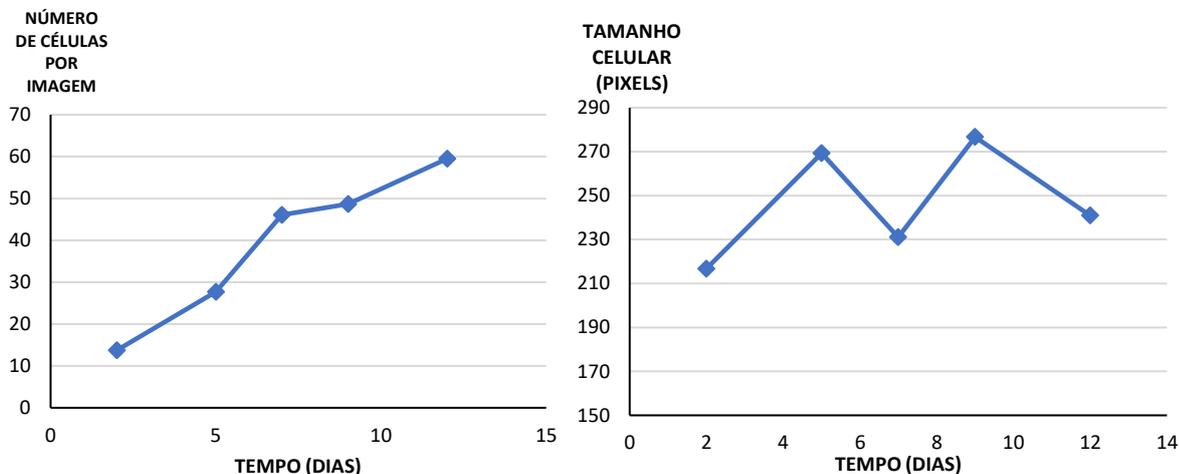


Figura 26. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra CS.

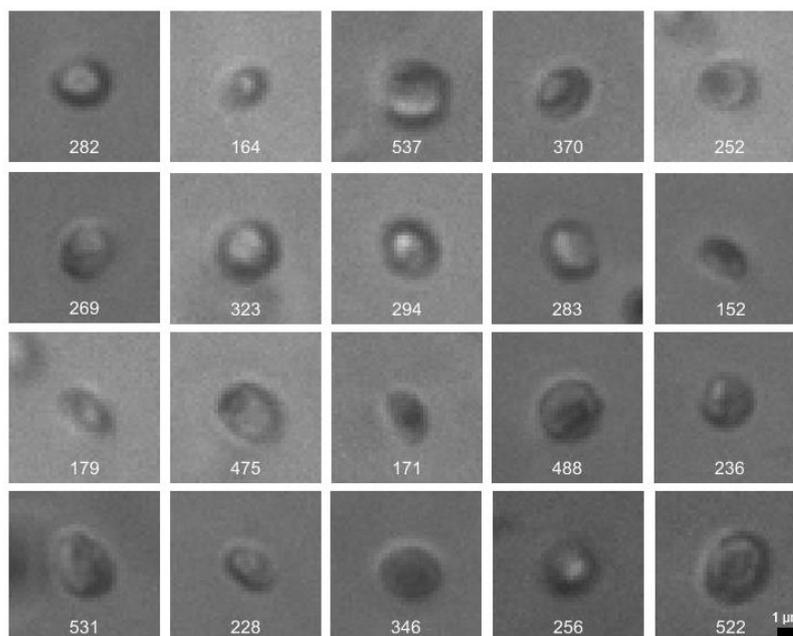


Figura 27. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra CS na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.

Na amostra BIOF, entre o segundo e quinto dia de cultivo houve aumento de tamanho das células, indo de 223 para 272 pixels, assim como aumento de tamanho junto com crescimento da cultura (Figura 28). Além disso, esse foi o maior aumento observado da amostra. A inflexão no nono dia com tendência à redução da quantidade de algas pode ter sido causada pela saturação do instrumento. Por ser baseado em imagens, maiores densidades de células obstruem ainda mais a intensidade da iluminação do instrumento e como consequência, células com bordas menos definidas podem não ser detectadas pelo algoritmo. O efeito prático dessa limitação é que o instrumento subestima o valor da densidade no quinto ponto (nono dia), tanto no BIOF quanto no SP. Na Figura 29 é possível observar algumas das imagens obtidas da amostra BIOF.

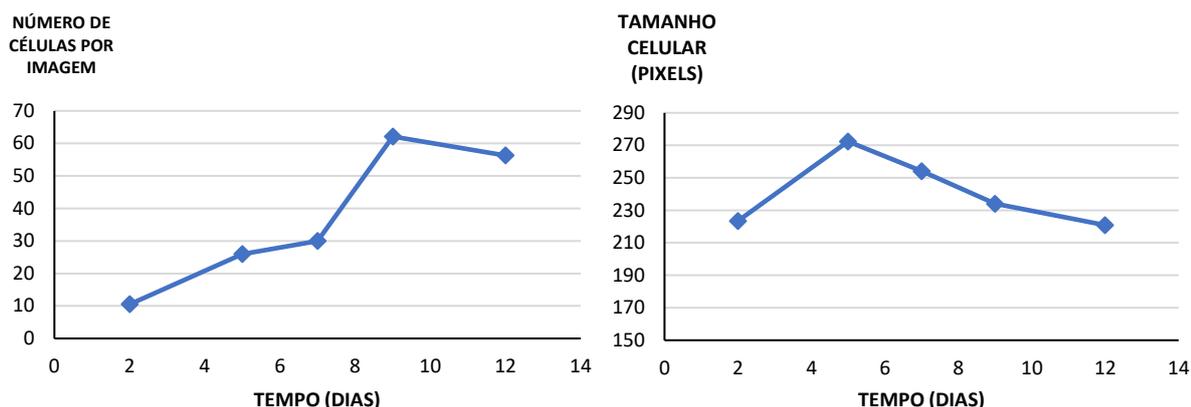


Figura 28. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra BIOF.

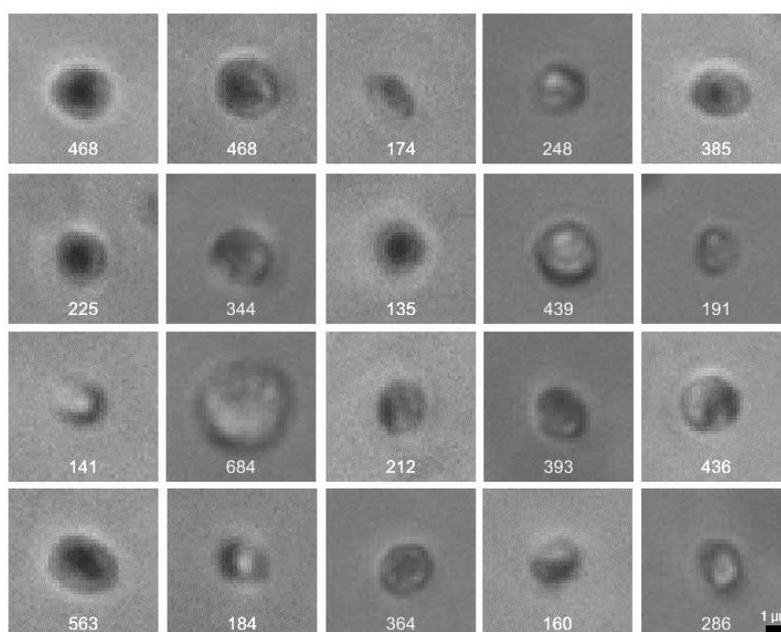


Figura 29. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra BIOF na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.

Na amostra SP, entre 2 e 5 dias de cultivo (primeiro e segundo pontos) houve aumento de tamanho das células, de 217 para 273 pixels, e houve aumento de tamanho junto com crescimento da cultura (Figura 30). Além disso, esse foi o maior aumento observado do cultivo. Observa-se que nos meios BIOF e SP, a densidade de células dobrou num período de 48 horas e a taxa de crescimento nesse período superou a dos demais os períodos observados em todos os meios. Na Figura 31 é possível observar algumas das imagens obtidas da amostra SP.

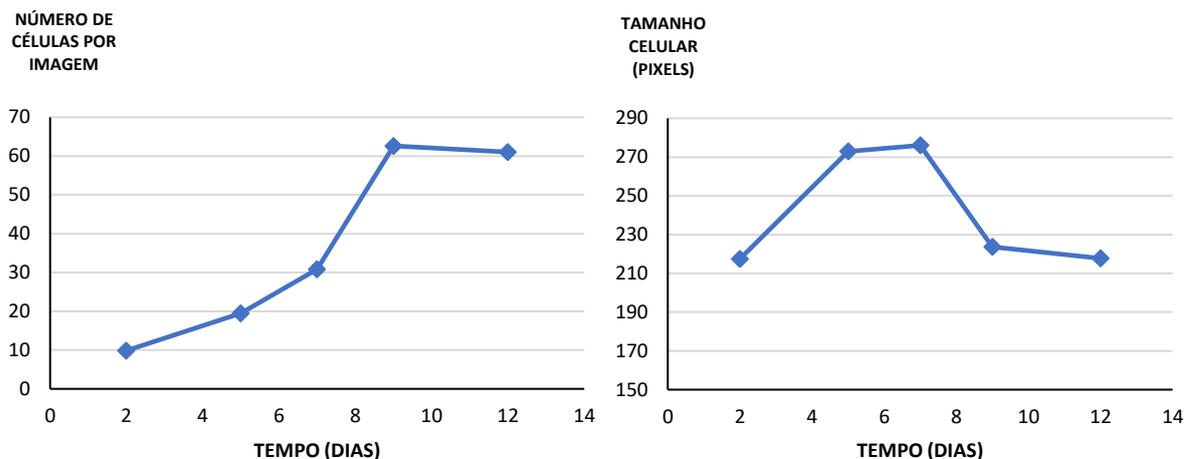


Figura 30. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra SP.

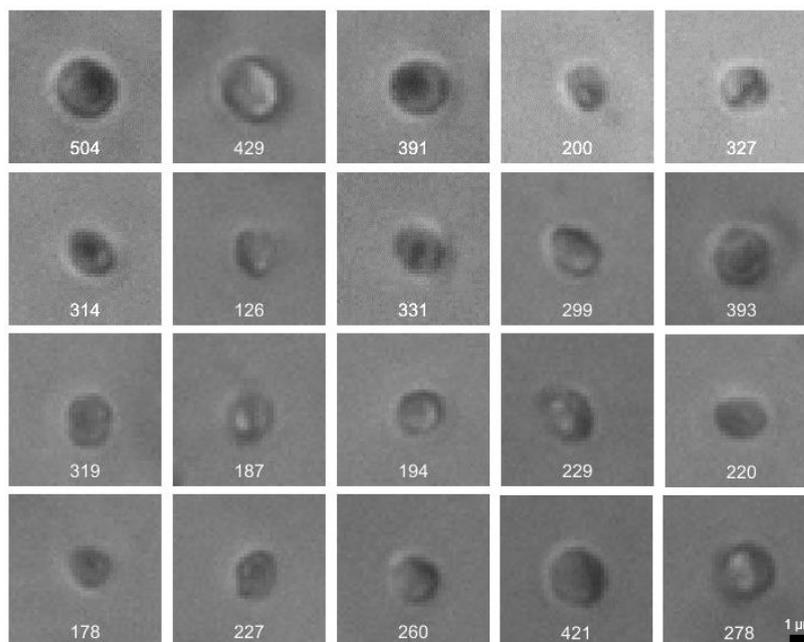


Figura 31. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra SP na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.

Também é possível reparar que entre os pontos 3 e 4 dos gráficos há o maior crescimento do número de células e a diminuição do tamanho celular, o que pode indicar um consumo de energia interna para aumento da capacidade de replicação e conseqüente diminuição do tamanho das células.

Assim como foi observado no CS, as microalgas presentes na amostra AIA cresceram continuamente durante 120 horas após a inoculação (quinto ponto da Figura 32). A partir desse período, observou-se uma inflexão para, novamente, voltar a crescer à mesma taxa que antecedeu a inflexão. A curva mostra ainda que a cultura crescia continuamente (com exceção da inflexão no quarto ponto), mas que o tempo de cultivo pode ter sido insuficiente para que a cultura atingisse sua região estacionária de crescimento. O pico do aumento do tamanho celular também ocorreu entre o segundo e o quinto dia, havendo variação de 220 para 264 pixels. Esta variação, porém, foi menor do que a observada nas outras amostras. Portanto, além do crescimento em número de células, as células microalgais cresceram em tamanho até o final do cultivo. Na Figura 33 é possível observar algumas das imagens obtidas da amostra AIA.

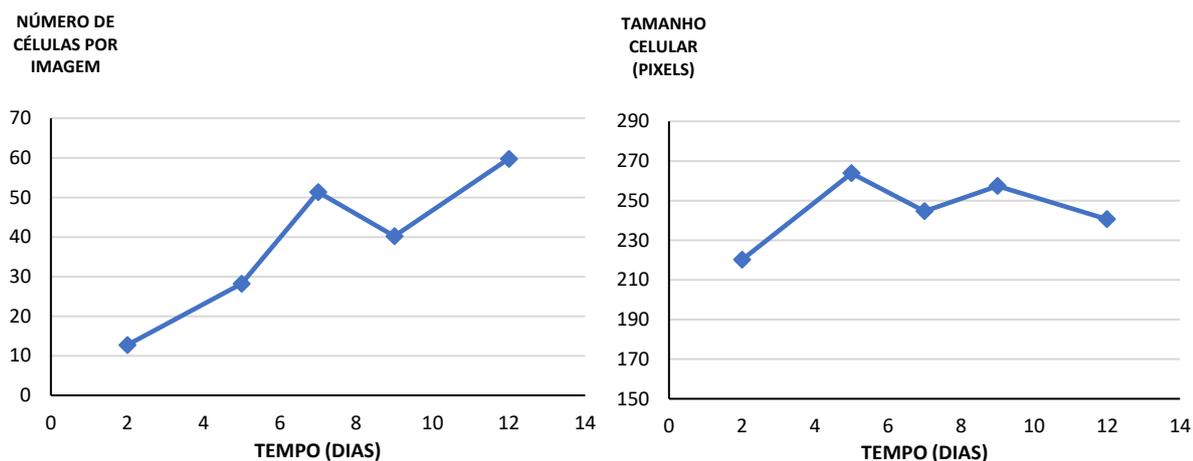


Figura 32. Dados da análise por imagens da batelada 4 referentes à amostra AIA.

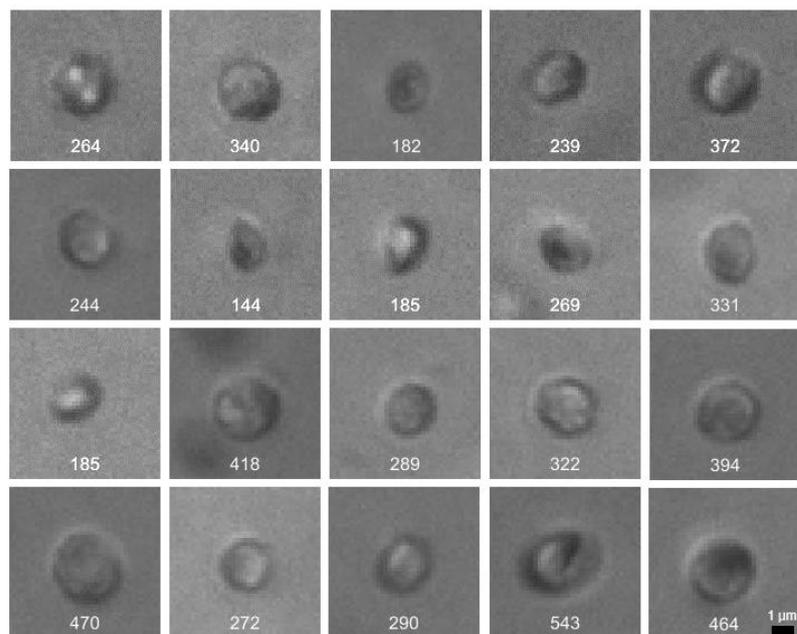


Figura 33. Coletânea de retratos coletados aleatoriamente do conjunto de algas detectadas pelo algoritmo da amostra AIA na batelada 4. O valor indica o tamanho da alga conforme determinado pelo algoritmo e corresponde à quantidade de pixels contido dentro do objeto. Os retratos possuem tamanho igual a 40 x 40 pixels.

6. CONCLUSÃO

Ao longo das quatro bateladas realizadas o efluente de reator UASB se mostrou mais favorável ao cultivo, onde as amostras obtiveram maiores valores de crescimento celular das microalgas e remoção de nutrientes dissolvidos. Ao mesmo tempo, para ambos os meios de cultivo a aeração se mostrou um fator muito importante no desenvolvimento dos microrganismos. Nas amostras sem aeração a maior concentração celular atingida foi de $7,4 \cdot 10^6$ cel/ml, enquanto nas amostras com aeração foi de $1,8 \cdot 10^7$ cel/ml.

Em todas as bateladas os resultados de concentração de células e crescimento das amostras contendo apenas *C. sorokiniana* foram próximos dos valores das demais amostras, não havendo destaque dos consórcios com bactérias. Portanto, visando crescimento celular microalgal e produção de biomassa, nenhum dos tratamentos se mostrou vantajoso.

Além disso, pelas análises estatísticas, de forma geral, foi possível concluir que entre o 7º e o 12º dias de cultivo não há ganho estatisticamente significativo no número de células, portanto 7 dias já seriam suficientes para obter os resultados desejados.

No entanto, em relação à remoção de nutrientes, os resultados obtidos na batelada 4 são próximos àqueles encontrados na literatura e apresentam o consórcio SP como uma possível alternativa ao uso apenas da microalga, chegando a 79% menos nitrogênio e 84% menos fósforo dissolvidos. Para estudos futuros, visando aumentar as taxas de remoção de fósforo e nitrogênio, poderiam ser estudado se o controle do pH e da intensidade de luz tem influência positiva ou negativa nos cultivos.

Nas bateladas realizadas neste estudo os valores de absorbância e de fluorescência, ambos indicadores indireto do crescimento microalgal, se mostraram similares àqueles obtidos pela contagem de células em câmara de Fuchs-Rosenthal, indicador direto de crescimento. Isto indicaria a possibilidade de usá-las como substitutas para a contagem, visto que são técnicas mais rápidas de serem realizadas e exigem menos treinamento para sua execução.

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012.
- ABINANDAN, S.; SUBASHCHANDRABOSE, S. R.; VENKATESWARLU, K.; MEGHARAJ, M. Nutrient removal and biomass production: advances in microalgal biotechnology for wastewater treatment. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s. l.], v. 38, n. 8, p. 1244–1260, 2018.
- AFNOR - ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. ESSAIS DES EAU. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. **Norme Expérimentale**, [s. l.], p. T90-304, 1980.
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 971, 2017.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (EDS.). **Microalgas de águas continentais**. Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2014.
- ASMARE, A. M.; DEMESSIE, B. A.; MURTHY, G. S. Investigation of Microalgae Co-Cultures for Nutrient Recovery and Algal Biomass Production from Dairy Manure. **Applied Engineering in Agriculture**, [s. l.], p. 335–342, 2014.
- BELINI, V. L.; WIEDEMANN, P.; SUHR, H. In situ microscopy: A perspective for industrial bioethanol production monitoring. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 93, n. 3, p. 224–232, 2013.
- BRIDGEWATER, L. L.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; RICE, E. W.; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION (EDS.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23rd edition ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2017.
- DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J.-P.; MOREY, T.; BASHAN, Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Research**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 466–474, 2004.
- DE-BASHAN, L. E.; TREJO, A.; HUSS, V. A. R.; HERNANDEZ, J.-P.; BASHAN, Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 11, p. 4980–4989, 2008.
- DE-BASHAN, L.; MORENO, M.; HERNANDEZ, J.-P.; BASHAN, Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Water Research**, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 2941–2948, 2002.
- FOX, J.; BOUCHET-VALAT, M. **Rcmdr: R Commander. R package version 2.3-2**, 2017.
- GODOS, I. De; VARGAS, V. A.; BLANCO, S.; GONZÁLEZ, M. C. G.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; BECARES, E.; MUÑOZ, R. A comparative evaluation of microalgae for the

degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 14, p. 5150–5158, 2010.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Digital Image Processing, Third Edition. **Journal of Biomedical Optics**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 029901, 2008.

GONZÁLEZ-CAMEJO, J.; BARAT, R.; PACHÉS, M.; MURGUI, M.; SECO, A.; FERRER, J. Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 503–515, 2018.

HAMEED, M. S. A. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. **Afr. J. Biotechnol.**, [s. l.], p. 7, 2007.

HENA, S.; FATIHAH, N.; TABASSUM, S.; ISMAIL, N. Three stage cultivation process of facultative strain of *Chlorella sorokiniana* for treating dairy farm effluent and lipid enhancement. **Water Research**, [s. l.], v. 80, p. 346–356, 2015.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B.; COCA, M.; SOLANA, M.; BERTUCCO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 285, p. 449–458, 2016.

HERNANDEZ, J.-P.; DE-BASHAN, L. E.; RODRIGUEZ, D. J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 88–93, 2009.

HO, S.-H.; CHEN, C.-Y.; CHANG, J.-S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering. [s. l.], v. 113, Special issue on the Challenges in Environmental Science and Engineering, p. 244–252, 2012.

JI, X.; JIANG, M.; ZHANG, J.; JIANG, X.; ZHENG, Z. The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 247, p. 44–50, 2018.

JIA, H.; YUAN, Q. Ammonium removal using algae–bacteria consortia: the effect of ammonium concentration, algae biomass, and light. **Biodegradation**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 105–115, 2018.

KIM, Y.; BAE, B.; CHOUNG, Y. Optimization of biological phosphorus removal from contaminated sediments with phosphate-solubilizing microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 23–29, 2005.

KLIGERMAN, D. C.; BOUWER, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 52, p. 1834–1846, 2015.

KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 33, p. 125–129, 2015.

KUMAR, K.; DAS, D. Growth characteristics of *Chlorella sorokiniana* in airlift and bubble column photobioreactors. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 116, p. 307–313, 2012.

LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 66, p. 204–213, 2014.

LIANG, Z.; LIU, Y.; GE, F.; XU, Y.; TAO, N.; PENG, F.; WONG, M. Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 1383–1389, 2013.

MA, X.; ZHOU, W.; FU, Z.; CHENG, Y.; MIN, M.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, P.; RUAN, R. Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 167, p. 8–13, 2014.

MANTZOROU, A.; NAVAKOUDIS, E.; PASCHALIDIS, K.; VERVERIDIS, F. Microalgae: a potential tool for remediating aquatic environments from toxic metals. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1815–1830, 2018.

MUJTABA, GHULAM; LEE, KISAY. Advanced treatment of wastewater using symbiotic co-culture of microalgae and bacteria. **공업화학**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–9, 2016.

PENG, Y. Z.; MA, Y.; WANG, S. Y. Improving nitrogen removal using on-line sensors in the A/O process. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 48–55, 2006.

POWELL, N.; SHILTON, A.; PRATT, S.; CHISTI, Y. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 704–709, 2011.

QI, W.; MEI, S.; YUAN, Y.; LI, X.; TANG, T.; ZHAO, Q.; WU, M.; WEI, W.; SUN, Y. Enhancing fermentation wastewater treatment by co-culture of microalgae with volatile fatty acid- and alcohol-degrading bacteria. **Algal Research**, [s. l.], v. 31, p. 31–39, 2018.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

SANTOS, A. C. Estudo ecofisiológico de *Haematococcus pluvialis*. **Tese apresentada a Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutor em Ciências**, [s. l.], p. 125, 2015.

SANTOS, A. L. S. Isolamento de bactérias associadas a cultivos monoalgal e pesquisa de fatores de crescimento vegetal. **Trabalho de conclusão de curso, Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos.**, [s. l.], 2018.

SANTOS, C. A.; REIS, A. Microalgal symbiosis in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 13, p. 5839–5846, 2014.

SFORZA, E.; PASTORE, M.; SPAGNI, A.; BERTUCCO, A. Microalgae-bacteria gas exchange in wastewater: how mixotrophy may reduce the oxygen supply for bacteria. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 25, n. 28, p. 28004–28014, 2018.

SIEFERMANN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 561–568, 1987.

SILVA, G. H. R.; SUEITT, A. P. E.; HAIMES, S.; TRIPIDAKI, A.; VAN ZWIETEN, R.; FERNANDES, T. V. Feasibility of closing nutrient cycles from black water by microalgae-based technology. **Algal Research**, [s. l.], v. 44, p. 101715, 2019.

SOILLE, P. **Morphological Image Analysis**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2003. Disponível em: <<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.springer-da2d1af3-2b6d-38ae-9e04-a964275ae1a5>>. Acesso em: 7 mar. 2021.

SOLTYS, Z.; ORZYLOWSKA-SLIWINSKA, O.; ZAREMBA, M.; ORLOWSKI, D.; PIECHOTA, M.; FIEDOROWICZ, A.; JANECZKO, K.; ODERFELD-NOWAK, B. Quantitative morphological study of microglial cells in the ischemic rat brain using principal component analysis. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 50–60, 2005.

SUHR, H.; WEHNERT, G.; SCHNEIDER, K.; BITTNER, C.; SCHOLZ, T.; GEISSLER, P.; JÄHNE, B.; SCHEPER, T. In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus: IN SITU MICROSCOPY. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 106–116, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://site.ebrary.com/id/10794639>>. Acesso em: 20 abr. 2020.

VELAZQUEZ-LUCIO, J.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; COLLA, L. M.; SÁENZ-GALINDO, A.; CERVANTES-CISNEROS, D. E.; AGUILAR, C. N.; FERNANDES, B. D.; RUIZ, H. A. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. **Biofuel Research Journal**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 780–791, 2018.

WANG, M.; YANG, Y.; CHEN, Z.; CHEN, Y.; WEN, Y.; CHEN, B. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 222, p. 130–138, 2016.

WIEDEMANN, P.; GUEZ, J. S.; WIEGEMANN, H. B.; EGNER, F.; QUINTANA, J. C.; ASANZA-MALDONADO, D.; FILIPAKI, M.; WILKESMAN, J.; SCHWIEBERT, C.; CASSAR, J. P.; DHULSTER, P.; SUHR, H. In situ microscopic cytometry enables noninvasive viability assessment of animal cells by measuring entropy states. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 108, n. 12, p. 2884–2893, 2011.

XUE, L.; SHANG, H.; MA, P.; WANG, X.; HE, X.; NIU, J.; WU, J. Analysis of growth and lipid production characteristics of *Chlorella vulgaris* in artificially constructed consortia with symbiotic bacteria. **Journal of Basic Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 358–367, 2018.

Anexo I – Composição dos meios de cultura

1.1 Composição do Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979)

Componente	Concentração Final (mol/L)
Nitrato de sódio (NaNO ₃)	1,76.10 ⁻²
Fosfato de potássio bibásico (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O)	1,75.10 ⁻⁴
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	3,04.10 ⁻⁴
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	2,45.10 ⁻⁴
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	1,89.10 ⁻⁴
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	3,12.10 ⁻⁵
Citrato de amônio férrico	3,00.10 ⁻⁵
MgNa ₂ EDTA.H ₂ O	2,79.10 ⁻⁶
Metais traço	
Nitrato de cobalto (Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O)	1,70.10 ⁻⁷
Sulfato de cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O)	3,16.10 ⁻⁷
Molibdato de sódio (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	1,61.10 ⁻⁶
Sulfato de zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	7,65.10 ⁻⁷
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	4,63.10 ⁻⁵

1.2 Composição da solução PBS

Componente	Concentração Final (g/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	8,0
Cloreto de potássio (KCl)	0,2
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	1,44
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,24
pH = 7,4	

1.3 Composição do meio LC Oligo (AFNOR, 1980) modificado por Santos (2015)

Solução 1	Concentração final (mol/L)
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	$2,4 \cdot 10^{-7}$
Molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	$4,8 \cdot 10^{-8}$
Sulfato de Zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	$2,0 \cdot 10^{-7}$
Cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	$2,52 \cdot 10^{-7}$
Sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	$2,4 \cdot 10^{-7}$
Ácido bórico (H_3BO_3)	$9,8 \cdot 10^{-7}$
Solução 2	
Cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	$3,1 \cdot 10^{-6}$
Sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	$2,24 \cdot 10^{-6}$
Citrato de ferro ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	$2,9 \cdot 10^{-6}$
Solução 3	
Nitrato de Cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	$3,4 \cdot 10^{-4}$
Solução 4	
Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)	$2,86 \cdot 10^{-7}$
Solução 5	
Fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4)	$4,6 \cdot 10^{-4}$
Solução 6	
Nitrato de Potássio (KNO_3)	$2,0 \cdot 10^{-3}$
Solução 7	
Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	$2,4 \cdot 10^{-4}$
Solução 8	
Bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3)	$7,16 \cdot 10^{-4}$