

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**CULTIVO DE MICROALGAS E REDUÇÃO DE  
COLIFORMES EM EFLUENTE DE TRATAMENTO  
ANAERÓBIO**

**Adriano Evandir Marchello**

**São Carlos – 2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**Adriano Evandir Marchello**

**CULTIVO DE MICROALGAS E REDUÇÃO DE  
COLIFORMES EM EFLUENTE DE TRATAMENTO  
ANAERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Profa Dra Ana Teresa Lombardi**

**São Carlos – 2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M316cm Marchello, Adriano Evandir.  
Cultivo de microalgas e redução de coliformes em  
efluente de tratamento anaeróbio / Adriano Evandir  
Marchello. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
55 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2013.

1. Microbiologia ambiental. 2. Microalgas. 3. Tratamento  
de efluentes. 4. Coliformes. I. Título.

CDD: 576.15 (20ª)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

## Relatório de Defesa de Dissertação Candidato: Adriano Evandir Marchello

Aos 23/02/2013, às 09:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: CULTIVO DE MICROALGAS E REDUÇÃO DE COLIFORMES EM EFLUENTE DE TRATAMENTO ANAERÓBIO, apresentada pelo candidato Adriano Evandir Marchello. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

### Participantes da Banca

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
Profa. Dra. Odete Rocha  
Profa. Dra. Jandira Liria Biscalquini Talamoni

Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	UNESP - Bauru

Conceito  
*aprovado*  
*aprovado*  
*Aprovado*

Resultado Final: *Aprovado*

### Parecer da Comissão Julgadora\*:

*Aprovado com distinção e louvor.*

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, João Augusto da Silva Affonso, representante do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi

Profa. Dra. Odete Rocha

Profa. Dra. Jandira Liria Biscalquini Talamoni

Representante do PPG: João Augusto da Silva Affonso

Não houve alteração no título da dissertação ( ) Houve. O novo título passa a ser:

\*Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Para gozar dos direitos do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, o candidato ainda precisa ter sua dissertação homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

**Dedico este trabalho à mais  
nova integrante da família, Maressa**

**“Feliz é o homem que acha sabedoria, e o homem  
que adquire entendimento.”**

**Provérbios 3:13**

**“Ora, se algum de vós tem falta de sabedoria, peça-a  
a Deus, que a todos dá liberalmente e não  
censura, e ser-lhe-á dada.”**

**Tiago 1:5**

## Agradecimentos

Primeiramente agradeço a DEUS pela oportunidade de estudar suas maravilhosas criações, os seres vivos, e por me dar sabedoria e força para seguir os meus objetivos.

À minha família: meus pais, Adilson e Rosana, irmã, Amanda, e avós, João, Teresinha e Laurinda (*in memoriam*) por sempre terem me apoiado e confiado em mim.

À Profa Dra Ana Teresa Lombardi, pela orientação neste mestrado, por todo auxílio, conhecimento transmitido e as broncas, enriquecendo minha vida tanto profissional quanto pessoal.

Ao Prof Dr Clóvis Wesley Oliveira de Souza, Depto de Morfologia e Patologia, pelo auxílio, conhecimentos transmitidos na área de Microbiologia e participação na banca de qualificação.

À Profa Dra Odete Rocha, Depto Ecologia e Biologia Evolutiva, pelo empréstimo de materiais e equipamentos de seu laboratório para as análises de fitoplâncton, além das sugestões transmitidas ao longo do trabalho e na banca de qualificação.

À Dra Maria José Dellamano-Oliveira pela ajuda na identificação e quantificação das microalgas.

À Profa Dra Marcela Bianchessi Cunha-Santino, do Depto de Hidrobiologia, pelos conselhos e conhecimentos transmitidos, tanto pessoalmente quanto na banca de qualificação, sobre biogeoquímica em ambientes aquáticos.

À Profa Dra Jandira Liria Biscalquini Talamoni, Unesp-Bauru, pelos conselhos ao longo de toda minha vida acadêmica, por ter me estimulado a seguir mestrado em Ecologia e por participar da banca de defesa.

À Profa Dra Célia Leite Sant'Anna, do Instituto de Botânica de São Paulo, pela identificação da *Chlorella vulgaris*.

Aos meus mais que amigos, irmãos do laboratório: Jaqueline Carmo, Alexsandro Claudino e Graziela Montanhim. A Dra Renata Haneda pelos conselhos e dicas. Ao Jonathan Nunes por sempre me dar apoio e me tranquilizar nos momentos de estresse.

Ao Sistema Autônomo de Água e Esgoto de São Carlos pela disponibilização de dados e pessoal para as coletas realizadas na estação de tratamento do distrito de Água Vermelha.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, colegas de pós, professores e coordenação.

À FAPESP e Braskem S.A. (proc. 2008/03487-0) e, CNPq (proc. 314361/2009; 302837/2012-4) pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>07</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>08</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>09</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivos Específicos.....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. Coleta.....	22
3.2. Condições experimentais.....	23
3.3. pH.....	24
3.4. Clorofila <i>a</i> .....	25
3.5. Nutrientes.....	25
3.6. Análise fitoplanctônica.....	25
3.6.1. Qualitativa.....	25
3.6.2. Quantitativa.....	26
3.7. Análise microbiológica.....	26
3.8. Análise estatística.....	27
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>45</b>



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema ilustrativo do processo de eutrofização em ambientes aquáticos e suas consequências.....11
- Figura 2** – Esquema ilustrativo dos principais processos microbiológicos da digestão em reatores de tratamento de esgoto anaeróbio: hidrólise, acidogênese e metanogênese.....14
- Figura 3** – Esquema ilustrativo das relações entre a autotrofia das microalgas e a heterotrofia das bactérias nos processos de ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos levando a uma retroalimentação (*feedback*) positivo e ao equilíbrio autossustentável.....17
- Figura 4** – Foto da estação de tratamento de esgoto de Água Vermelha, São Carlos, SP. Em destaque os biorreatores anaeróbios.....22
- Figura 5** – Esquema do delineamento experimental mostrando os tipos de bioensaios e o número de repetições de cada.....24
- Figura 6** – Variação dos valores de pH nos fotobiorreatores em função do tempo experimental nos bioensaios aerados (quadrados cheios) e não aerados (quadrados vazios).....28
- Figura 7** – Variações da concentração de clorofila *a* (mg/L) apresentada em log natural (ln) nos fotobiorreatores em função do tempo experimental nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerados (quadrados vazios).....29
- Figura 8** – Densidade de grupos fitoplanctônicos (células/mL) no bioensaio aerado ao longo do tempo experimental. Colunas brancas representam a classe Chlorophyceae, as pretas a classe Cyanophyceae, e as cinzas *Outros Grupos* (classes Chrysophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae).....33
- Figura 9** – Densidade de grupos fitoplanctônicos (células/mL) no bioensaio não aerado ao longo do tempo experimental. Colunas brancas representam a classe Chlorophyceae, as pretas a classe Cyanophyceae, e as cinzas *Outros Grupos* (classe Euglenophyceae).....34
- Figura 10** – Densidade de coliformes totais nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerado (quadrados vazios) ao longo do período experimental reportada em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).....34
- Figura 11** – Densidade de *Escherichia coli* nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerado (quadrados vazios) ao longo do período experimental reportada em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).....35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Parâmetros analisados mensalmente e valores médios ( $\pm$ desvio padrão) para o ano de 2011, no efluente de tratamento secundário anaeróbio da ETE de Água Vermelha.....	23
<b>Tabela 2</b> – Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) da concentração de nutrientes ( $\mu\text{g/L}$ ) em amostra inicial e no final do experimento (bioensaio aerado e não aerado). NTK = nitrogênio total Kjeldahl.....	30
<b>Tabela 3</b> – Porcentagem (%) de redução da concentração dos nutrientes nos bioensaios aerado e não aerado em relação com a concentração inicial no efluente secundário.....	30
<b>Tabela 4</b> – Bioensaio aerado. Composição taxonômica e abundância relativa de microalgas por dia de amostragem reportada em porcentagem (%) dos táxons durante o período experimental, com amostragens nos dias 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30.....	31
<b>Tabela 5</b> – Bioensaio não aerado. Composição taxonômica e abundância relativa de microalgas por dia de amostragem reportada em porcentagem (%) dos táxons durante o período experimental, com amostragens nos dias 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30.....	32

## RESUMO

Os efluentes de estações de tratamento de esgoto apresentam elevada concentração de nutrientes inorgânicos, como nitrogênio (N) e fósforo (P), que podem ser usados para o crescimento algal. Dada à essa possibilidade, o uso desse resíduo pode tornar-se uma estratégia para a redução dos custos de produção de microalgas e/ou abatimento de gastos em estações de tratamento de esgoto. Isso teria como consequência a redução dos nutrientes e de bactérias coliformes no efluente, melhorando assim sua qualidade antes do descarte final. Esta pesquisa teve como objetivo principal monitorar a comunidade de microalgas nativas e bactérias coliformes em efluente resultante de tratamento anaeróbio de esgoto municipal. Foram realizados 2 bioensaios, um aerado e outro não aerado em amostras de 5 L incubadas em casa de vegetação com ambiente semi-controlado. Os resultados mostraram que não houve variação significativa do pH para qualquer um dos bioensaios. Detectou-se redução de 99,9% de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) tanto de coliformes totais, quanto *Escherichia coli*. O bioensaio aerado apresentou redução nas concentrações de nutrientes (N e P). A curva de crescimento da comunidade de microalgas apresentou uma fase de adaptação inicial apenas no bioensaio aerado, enquanto que no não aerado, o crescimento foi exponencial desde o início da incubação. *Chlorella vulgaris* foi a microalga dominante na comunidade fitoplanctônica em qualquer um dos bioensaios (99% do total). No bioensaio aerado, 12 táxons distribuídos em 5 classes algais estiveram presentes (Chlorophyceae, Cyanophyceae, Chrysophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae), enquanto que no não aerado, apenas 3 classes foram identificadas (Chlorophyceae, Cyanophyceae e Euglenophyceae), com 6 táxons. Dos resultados obtidos, conclui-se que o efluente de esgoto anaeróbio suportou o crescimento algal, principalmente da Chlorophyceae *Chlorella vulgaris*, que melhorou a qualidade do efluente, reduzindo seu potencial de eutrofização. Conclui-se ainda que a aeração do efluente é indicada quando se objetiva, além da produção de microalgas, a redução de nutrientes.

Palavras-chave: produção de microalgas, tratamento terciário biológico, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Chlorella vulgaris*

## ABSTRACT

Effluents from sewage treatment plants usually have high concentration of inorganic nutrients such as nitrogen (N) and phosphorus (P), which can be used for algal growth. Due to this possibility, the use of such wastewater can become a strategy for reducing the cost of microalgae production and/or reduction of costs in sewage treatment plants. This would result in the reduction of coliform bacteria and nutrients thereby improving the quality of effluent to be discharged. This research aimed to monitor the native community of microalgae and coliform bacteria from wastewater produced from anaerobic treatment of municipal sewage. Two bioassays were performed, an aerated and a non-aerated. Five liters samples of the wastewater were incubated in a greenhouse with semi-controlled environment using batch mode. The results showed no significant variation in pH for any of the bioassays. A reduction of 99.9% of colony forming units (CFU/mL) of both total coliforms and *Escherichia coli* was obtained after short period incubation. The concentrations of nutrients (N and P) decreased in the aerated bioassay, but not in the non aerated one. The growth curve of microalgae community presented an initial adjustment/adaptation phase only in the aerated bioassay, whereas in the non-aerated, microalgae growth was exponential since the beginning of incubation. The microalgae Chlorophyceae *Chlorella vulgaris* was dominant in the phytoplankton community in both bioassays coming to 99% of the total biomass. In the aerated bioassay, 12 taxa distributed into five classes were present (Chlorophyceae, Cyanophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae and Euglenophyceae), whereas in the non-aerated, only three classes were identified (Chlorophyceae, Cyanophyceae and Euglenophyceae), with 6 taxa. We conclude that the anaerobic sewage effluent supported algal growth, mainly the Chlorophyceae *Chlorella vulgaris* and improved the anaerobic sewage treatment wastewater quality, reducing their potential for eutrophication. We also conclude that effluent aeration is most useful when the objective is the production of microalgae and nutrients reduction.

Keywords: production of microalgae, biological tertiary treatment, total coliforms, *Escherichia coli*, *Chlorella vulgaris*

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história da humanidade, a ampliação produtiva das sociedades teve como contrapartida o aumento dos impactos sobre o ambiente natural. A intensa urbanização das cidades juntamente ao desenvolvimento das indústrias acarretou problemas de ordem social e ambiental, tais como: submoradias, favelização, acúmulo de lixo, poluição dos recursos hídricos, entre outros (Magnoli & Araújo, 2005; López-Rodas *et al.*, 2006; de Bashan *et al.*, 2010).

O lançamento indevido de efluentes domésticos sem tratamento em rios, lagos e mares levou à eutrofização acelerada de muitos desses ambientes (Odum & Barrett, 2007). A eutrofização pode ser definida como um processo de degradação ambiental resultante do aumento da concentração de nutrientes em ambientes aquáticos, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), levando à proliferação de algas e outros produtores primários, cujo crescimento e morte podem levar ao aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), criando condições anaeróbias e inadequadas para a manutenção ecológica saudável do ecossistema (Figura 1).

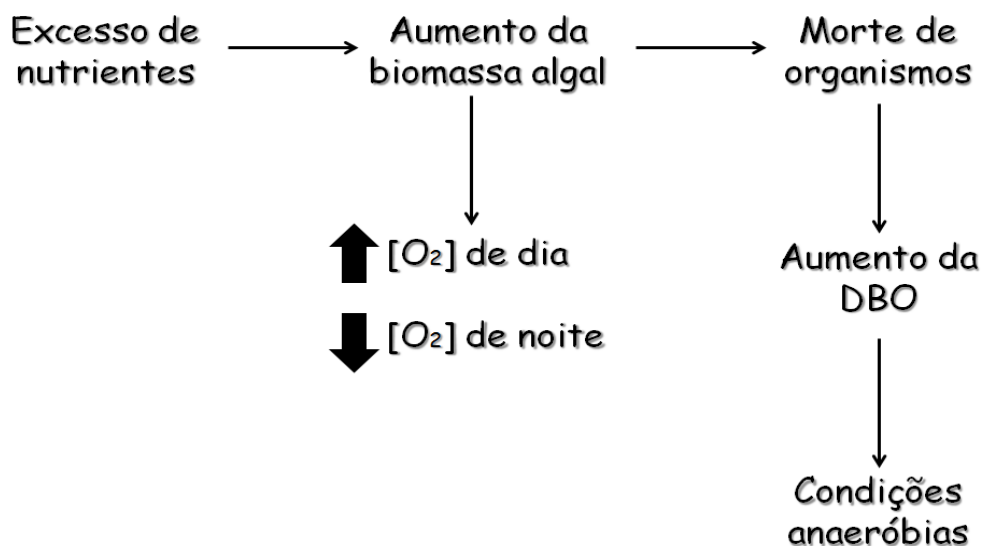


Figura 1 – Esquema ilustrativo do processo de eutrofização em ambientes aquáticos e suas consequências.

Um dos grandes problemas resultantes da eutrofização, quando esta atinge águas de abastecimento público, é o excesso de compostos nitrogenados e a presença de cianotoxinas, que são prejudiciais à saúde humana (König *et al.*, 1999; Camargo & Alonso, 2006). Um dos aspectos básicos a serem considerados visando à diminuição do aporte de nutrientes em ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, dos problemas resultantes da eutrofização é o tratamento de esgoto municipal. Além disso, o tratamento do esgoto auxilia na redução da proliferação de doenças e patógenos (Branco, 1986; Richmond, 1990; van der Hoek, 1995; Harrison, 1996; Wetzel, 2001; Reynolds, 2006; Tundisi *et al.*, 2008; Girard, 2010).

De uma maneira geral, o tratamento de esgoto pode ocorrer em quatro etapas: preliminar, primário, secundário e terciário.

O tratamento preliminar é constituído por processos físico-químicos de separação objetivando a remoção dos flutuantes, que é feito através de grades com malhas de tamanhos diferentes, a fim de reter os sólidos grosseiros.

O tratamento primário também é constituído por processos físico-químicos que objetivam a separação de partículas em suspensão através de floculação e sedimentação. Como resultado desta etapa, produzem-se lamas, que podem ser encaminhadas à digestão anaeróbia.

O tratamento secundário é constituído por processos microbiológicos de degradação da matéria orgânica seguidos de processos físico-químicos. O objetivo central deste tratamento é a redução do teor orgânico e de nutrientes (Metcalf & Eddy, 2003). O processo biológico pode se dar de duas maneiras distintas, na presença (aeróbio) ou ausência (anaeróbio) de oxigênio dissolvido.

O *tratamento aeróbio* tradicional é normalmente realizado em tanques de lodos ativados com o ar sendo insuflado através de arejador de superfície, ou lagoas arejadas na presença de macrófitas aquáticas, ou ainda leitos percoladores ou biodiscos.

O *tratamento anaeróbio* (Figura 2) utiliza lagoas ou digestores anaeróbios, onde segundo Metcalf & Eddy (2003) e van Lier *et al.* (2008), o processo de degradação da matéria orgânica por bactérias heterotróficas ocorre em três etapas diferentes, hidrólise, acidogênese e metanogênese.

- **Hidrólise:** o material particulado é convertido em compostos solúveis que podem ser hidrolisados em monômeros simples, os quais são facilmente utilizados pelas bactérias;
- **Acidogênese:** materiais orgânicos hidrolisados, tais como aminoácidos, açúcares e alguns ácidos orgânicos, são degradados e servem tanto como doadores quanto aceptores de elétrons; entre os produtos finais destacam-se o acetato, o hidrogênio, o gás carbônico, o propionato e o butirato, sendo estes dois últimos novamente fermentados até produzir os três primeiros produtos citados;
- **Metanogênese:** é realizado por micro-organismos anaeróbios obrigatórios do domínio *Archaea*, em especial os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta*; as metanogênicas acetoclásticas convertem o acetato da acidogênese em metano e gás carbônico, enquanto outras metanogênicas utilizam o hidrogênio como doador de elétrons e o gás carbônico comoceptor para produzir o gás metano.

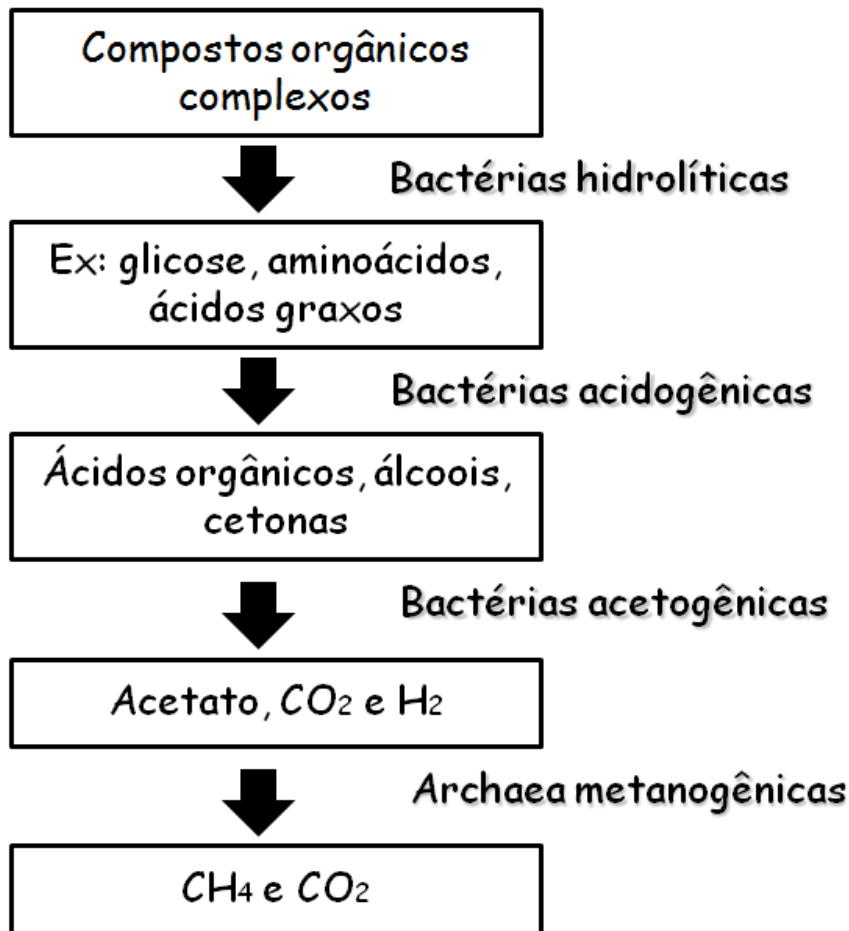


Figura 2 – Esquema ilustrativo dos principais processos microbiológicos da digestão em reatores de tratamento de esgoto anaeróbio: hidrólise, acidogênese e metanogênese.

Considerando os tratamentos de esgoto aeróbio e anaeróbio, significativa quantidade de nutrientes inorgânicos ainda permanecerá no efluente gerado. Dado às características dos diferentes processos e micro-organismos envolvidos, o tratamento anaeróbio produz efluentes com concentrações elevadas de nutrientes inorgânicos, enquanto no aeróbio ocorre remoção acentuada dos nutrientes. Ambos os tratamentos são eficientes quanto à remoção da carga orgânica (Metcalf & Eddy, 2003, Luostarinen *et al.*, 2006; Kassab *et al.*, 2010). Assim, os efluentes secundários gerados no tratamento de esgoto doméstico e que são lançados em corpo hídrico receptor, nem sempre



possuem uma composição física, química e/ou biológica adequada para o descarte, levando à contaminação dos ambientes receptores e daqueles onde esses deságuam (Zanetti *et al.*, 2006).

A presença de bactérias do grupo coliformes no efluente pode ser usada como bioindicador da presença de micro-organismos patogênicos os quais podem ser eliminados pelo tratamento do efluente (Oliveira *et al.*, 2006). Os coliformes incluem quatro gêneros da família Enterobacteriaceae, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* que estão presentes no trato intestinal de animais endotérmicos. Essas bactérias são de fácil detecção, podendo ser aeróbias ou anaeróbias facultativas (Tortora *et al.*, 2006; Gerba, 2008; Maier *et al.*, 2009).

Com a intenção de reduzir o potencial eutrofizante dos efluentes de esgoto doméstico, o tratamento terciário, ou polimento tem sido atualmente usado em muitos países. Esse tratamento pode ser químico e/ou biológico, com vantagens e desvantagens acompanhando cada caso. Enquanto o tratamento terciário fundamentado em reações químicas pode levar à geração de resíduos tóxicos (Monarca *et al.*, 2000; Koivunen *et al.*, 2005), o biológico é autossustentável (Cruz, 1997; Girard, 2010). Os objetivos do tratamento terciário biológico de efluente são, principalmente, oxidar constituintes biodegradáveis dissolvidos e particulados, capturar e incorporar coloides em flocos ou biofilmes, transformar ou remover nutrientes e, em alguns casos, remover constituintes orgânicos específicos (Metcalf & Eddy, 2003).

O tratamento terciário biológico pode ser realizado por meio de *wetlands* (ou áreas alagadas) construídas, utilizando macrófitas aquáticas (Moshiri, 1993; Stottmeister *et al.*, 2003), ou microalgas (Oswald, 1988a, 1988c; Hoffmann, 1998). O tratamento com microalgas pode incluir espécies planctônicas ou aderidas, neste caso formando os biofilmes (Tyagi *et al.*, 1990; Mara *et al.*, 2003; Olguín, 2003; Larsdotter,

2006; Morgenroth, 2008; Boelee *et al.*, 2011). Nesse tratamento, os produtores primários (macrófitas e microalgas) são os principais responsáveis pela remoção dos nutrientes inorgânicos e fornecem substrato para o crescimento microbiano heterotrófico.

Contudo, no tratamento terciário biológico, outras formas de remoção de nutrientes inorgânicos podem ocorrer, como, por exemplo, a volatilização do nitrogênio na forma de amônia e a precipitação do fósforo, que ocorre como resultado do aumento do pH induzido pelas algas durante a fotossíntese (Doran *et al.*, 1979; Oswald, 1988c; Proulx *et al.*, 1994; Hammouda *et al.*, 1995; Mesple *et al.*, 1996; Abeliovich, 2004; Larsdotter, 2006).

Além de redução da eutrofização nos corpos receptores, o tratamento terciário utilizando microalgas apresenta a vantagem de produção de biomassa desses organismos, que pode ser de interesse comercial e/ou usado para a redução dos custos operacionais do próprio tratamento de esgoto (Oswald, 1988c; de La Noüe *et al.*, 1992; Hammouda *et al.*, 1995; Hoffmann, 1998; Abeliovich, 2004; Park *et al.*, 2011; Pittman *et al.*, 2011; Olguín, 2012). A presença de nitrogênio e fósforo nos efluentes é que suporta em grande parte o crescimento algal, sendo o nitrogênio um nutriente essencial e constituinte estrutural da biomassa. Pode alcançar entre 1-10% da massa seca. O fósforo, também essencial, pode atingir de 1-1,5% da massa seca em microalgas, sendo constituinte dos ácidos nucleicos e adenosina fosfatos (Richmond, 2004).

A biomassa algal produzida em sistemas de tratamento terciário pode ser utilizada para a produção de biofertilizantes, para reflorestamento, como condicionador de solo, para produção de biocombustíveis e ainda, segundo dados recentes, para a geração de gás hidrogênio (Borowitzka, 1988; Barbosa, 2003; Derner *et al.*, 2006; Larsdotter, 2006; Trejo *et al.*, 2012). No entanto, essa biomassa não deve ser usada para

finalidades que requeiram pureza do produto, tais como o uso farmacológico ou alimentício (Bhatnagar *et al.*, 2011; Chistenson *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2011; Graham *et al.*, 2012).

O cultivo de microalgas em efluentes envolve a interação entre as cadeias tróficas baseada no fitoplâncton e a alça microbiana (Figura 3), sendo esta última baseada em bactérias heterotróficas. As bactérias heterotróficas utilizam o material orgânico presente no efluente para a construção de novas células e, como consequência natural, liberam nutrientes que são usados pelas microalgas. As bactérias são, ainda, ingeridas por consumidores secundários, como os protozoários, levando os nutrientes de volta à cadeia (Azam, 1998).

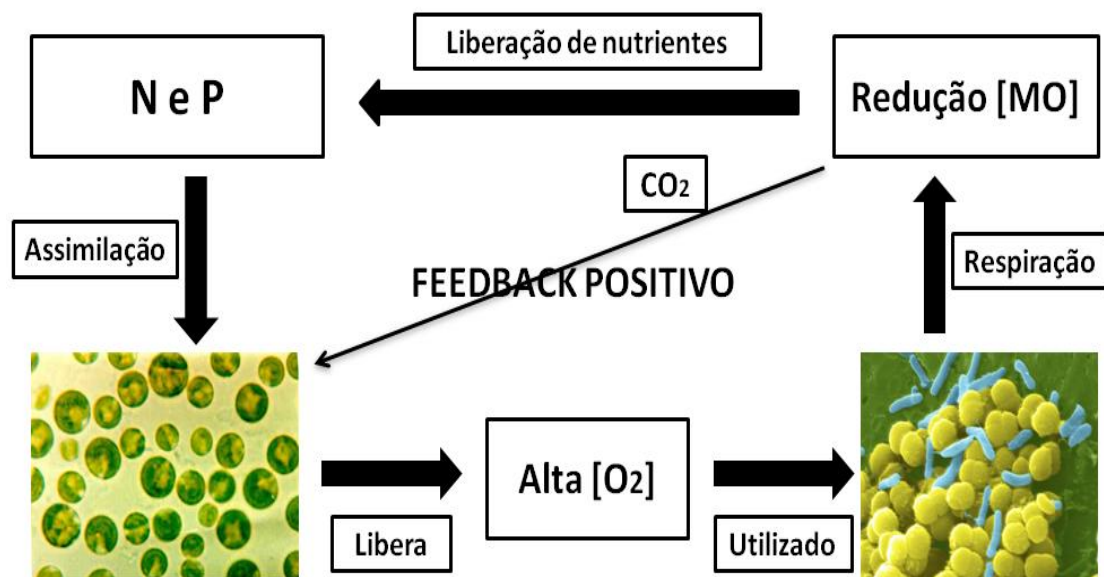


Figura 3 – Esquema ilustrativo das relações entre a autotrofia das microalgas e a heterotrofia das bactérias no processo de ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos levando a uma retroalimentação (*feedback*) positiva e ao equilíbrio autossustentável.

A ação de bactérias heterotróficas presentes no efluente, que decompõem a matéria orgânica biodegradável, liberando o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ), amônio ( $\text{NH}_4^+$ ),

nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), é importante para a disponibilização desses íons para as microalgas, que os utilizam para a geração de novos indivíduos (Olguín, 2003). As microalgas, por sua vez, liberam o oxigênio fotossintético, permitindo que as bactérias heterotróficas, através de respiração aeróbica, degradem a matéria orgânica e reduzam a DBO do efluente (Oswald, 1988b; de Bashan *et al.*, 2004; Soldatelli, 2007; Shanthala *et al.*, 2009).

As microalgas são capazes de remover eficientemente nutrientes do ambiente em seu entorno porque necessitam de grandes quantidades de nitrogênio e fósforo para produção de material celular, como proteínas, ácidos nucleicos, ATP e síntese de fosfolípidios (McGriff *et al.*, 1972; Rawat *et al.*, 2011).

As microalgas fazem parte dos organismos envolvidos nos processos biológicos de tratamento de esgotos, secundário e terciário, que consistem de uma mistura de comunidades com alta diversidade, incluindo bactérias, protozoários, fungos e rotíferos, além de organismos patogênicos (de La Noüe *et al.*, 1992; Harrison, 1996; Metcalf & Eddy, 2003). Segundo von Sperling (1996), alguns grupos algais predominam em relação a outros, dependendo das características físicas, químicas e biológicas dos efluentes.

Segundo Arceivala (1981), as microalgas são fundamentais no tratamento de efluentes e suas densidades podem superar à das bactérias, tornando a água de coloração esverdeada. Estudos sobre o uso de microalgas no tratamento de efluentes mostrou que o aumento de temperatura do meio e variação de pH, decorrentes do metabolismo algal, são responsáveis pela redução de organismos patogênicos. Além disso, antibióticos naturais e outros metabólitos produzidos pelas microalgas, e aderência à superfície celular das microalgas também auxiliam na redução dos patógenos (Pearson, 1986;

Oswald, 1988a; Mayo & Noike, 1994; Meiring *et al.*, 1994; Davies-Colley, 1997; Aksu, 1998; Metcalf & Eddy, 2003; Kiso *et al.*, 2005).

A dominância de determinados grupos de microalgas encontrados nos efluentes pode indicar a carga orgânica e o grau de tratamento alcançado (König, 1990), sendo que os gêneros mais comuns são: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Micractinium*, *Euglena*, *Ankistrodesmus*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Nitzschia*, *Navicula* e *Stigeoclonium* (Palmer, 1969; Mara & Pearson, 1998; Amengual-Morro *et al.*, 2012).

Além das vantagens ambientais já mencionadas, o cultivo de microalgas como tratamento terciário, tem sido considerado uma maneira de reduzir os custos de produção de biomassa algal, pois essa biomassa seria obtida a partir de um resíduo a ser descartado. Isso eliminaria a necessidade de uso de água e a adição de macro e micronutrientes, visto que já estão presentes no efluente secundário (Olguín, 2012).

Segundo Zhang *et al.* (2010), Chi *et al.* (2011) e Olguín (2012), a composição química dos efluentes de tratamento anaeróbico de esgoto é adequada para o crescimento algal. Os compostos nitrogenados são convertidos em amônio, fonte importante de nitrogênio para as microalgas (Kassab *et al.*, 2010). Outra vantagem, quanto ao uso de efluente anaeróbico para o crescimento de microalgas, é a presença de CO<sub>2</sub> na forma de bicarbonato, além de ácidos orgânicos que são utilizados no crescimento heterotrófico/mixotrófico de algumas microalgas (Larsdotter, 2006).

Considerando que o próprio efluente contém microalgas já adaptadas àquelas condições, e que essa comunidade pode variar com o efluente e suas características, entender a variação, composição e crescimento das populações autóctones de microalgas no efluente é importante para identificar quais microalgas podem ter interesse biotecnológico e em quais condições seu crescimento pode ser otimizado, vislumbrando-se uma produção algal em larga escala (Oswald, 1988b; Farina, 2011).

No presente estudo foi analisada qualitativa e quantitativamente a comunidade fitoplanctônica autóctone em efluente secundário de ETE baseada em tratamento anaeróbio, monitorando-se alguns parâmetros físicos e químicos, além de bactérias do grupo coliformes, durante incubação por 30 dias, simulando-se um tratamento terciário.

## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho objetivou avaliar o potencial de efluente resultante de tratamento de esgoto anaeróbio em promover o crescimento de microalgas autóctones e o efeito disso sobre bactérias do grupo coliformes.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- Analisar, quantitativa e qualitativamente, a comunidade de microalgas naturalmente presentes no efluente secundário submetido a dois bioensaios distintos, aerado e natural (não aerado);
- Analisar a comunidade de bactérias do grupo coliformes (totais e *Escherichia coli*) em dois bioensaios, efluente secundário aerado e natural (não aerado);
- Analisar o efeito do crescimento algal sobre a concentração dos nutrientes nitrogênio e fósforo no efluente secundário nos diferentes bioensaios.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta

Amostras de efluente secundário foram obtidas imediatamente após o tratamento anaeróbio e antes do descarte em corpo receptor na estação de tratamento de esgoto (ETE) no distrito de Água Vermelha (Figura 4), município de São Carlos, SP (Brasil). O esgoto que adentra ao sistema é oriundo do distrito de Água Vermelha e da oficina da empresa de transportes aéreos, TAM, situada nas imediações, portanto contém uma mistura de constituintes orgânicos (municipal) e inorgânicos (oficina TAM).



Figura 4 - Foto da estação de tratamento de esgoto de Água Vermelha, São Carlos, SP. Em destaque os biorreatores anaeróbios.



O efluente resultante do tratamento é monitorado mensalmente pela ETE, e os valores médios de alguns parâmetros são apresentados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Parâmetros analisados mensalmente e valores médios ( $\pm$  desvio padrão) para o ano de 2011, no efluente de tratamento secundário anaeróbico da ETE de Água Vermelha.

VARIÁVEL	VALOR MÉDIO ( $\pm$ desvio padrão)
pH	7,0 ( $\pm$ 0,35)
Oxigênio dissolvido (mg/L)	3,2 ( $\pm$ 0,61)
Nitrato (mg/L)	1,0 ( $\pm$ 0,001)
Nitrito (mg/L)	0,07 ( $\pm$ 0,007)
NTK (mg N/L)	40,6 ( $\pm$ 3,58)
Fósforo total (mg P/L)	4,8 ( $\pm$ 0,28)
Remoção de N (%)	6,7 ( $\pm$ 0,5)
Remoção de P (%)	4,0 ( $\pm$ 1,4)
Temperatura (°C)	24,0 ( $\pm$ 1,88)
Coliformes totais (UFC/mL)	$7,4 \times 10^4$ ( $\pm 5,02 \times 10^4$ )
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	$1,8 \times 10^4$ ( $\pm 3,5 \times 10^3$ )

Fonte: ETE Água Vermelha

### 3.2. Condições Experimentais

Amostras do efluente secundário resultante de tratamento anaeróbico (5 L) foram acondicionadas em fotobiorreatores (sistema estanque) com 8 L de capacidade cada, transparentes, revestidos internamente com sacos transparentes atóxicos de polietileno de baixa densidade (PBD). Os experimentos foram incubados na casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (Brasil) por 30 dias, em condições parcialmente controladas de temperatura (23 – 30 °C) e intensidade luminosa (2,7 klux às 8:00 h e máximo de 20 klux às 12:00 h), com fotoperíodo natural. Quatro fotobiorreatores receberam aeração artificial com a bomba Regente Air Pump

(modelo 8500), utilizado para a aeração em aquários, e quatro foram deixados sem aeração. Todos foram cobertos com filme plástico de PVC, que permite a passagem de gás. Portanto, cada bioensaio foi realizado com 4 réplicas como ilustrado na figura 5. Amostras para determinação das condições iniciais do efluente foram retiradas antes da incubação e imediatamente após a chegada do efluente ao laboratório. Não houve inoculação de microalgas, as mesmas analisadas neste trabalho são autóctones, ou seja, já se encontram no efluente de ETE. Antes de cada coleta, os fotobiorreatores eram agitados, promovendo a homogeneização do meio.

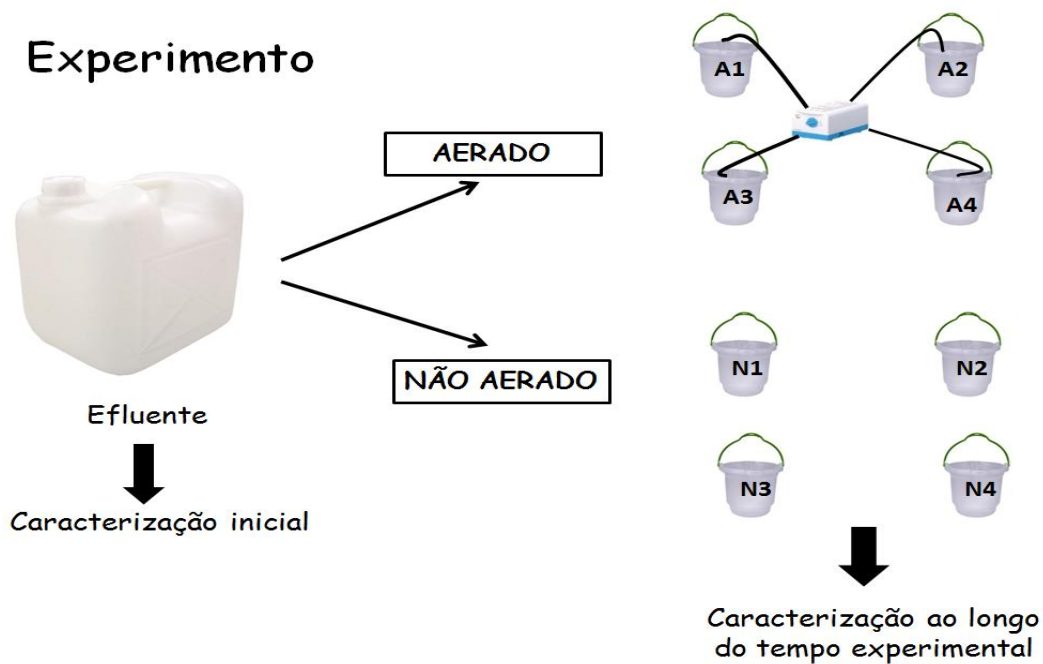


Figura 5 – Esquema do delineamento experimental mostrando os tipos de bioensaios e o número de repetições em cada.

### 3.3. pH

Os valores de pH foram medidos em dias alternados por meio de método potenciométrico, com o auxílio de um pH-metro portátil (pHep®, Brasil).

### **3.4. Concentração de clorofila *a***

A concentração de clorofila *a* foi determinada através de fluorescência *in vivo*, usando-se um fluorímetro da marca Turner Designs, U.S.A. (*modelo Trilogy*), por meio de equação obtida através de uma curva de calibração, plotando-se a intensidade de fluorescência *versus* a concentração de clorofila *a* extraída de culturas de *Chlorella sorokiniana* (Laboratório de Biotecnologia de Algas, DB, UFSCar).

### **3.5. Nutrientes**

Os nutrientes totais (nitrogênio total Kjeldahl e fósforo total) e dissolvidos (nitrato, nitrito, amônio, fósforo total dissolvido e fosfato inorgânico) foram determinados segundo APHA (2005).

Para tal, 500 mL de meio de cultivo (efluente da ETE) foram coletados no início e no final do experimento, sendo que para determinação dos nutrientes dissolvidos as amostras foram filtradas em membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de diâmetro de poro (Sartorius Stedim biotech), após filtração prévia em membranas com porosidade de 3 µm para redução do material em suspensão.

### **3.6. Análise Fitoplanctônica**

#### **3.6.1. Qualitativa**

As amostras para análise qualitativa da comunidade algal foram coletadas dos fotobiorreatores a cada 5 dias, preservadas em solução de formaldeído 4% e analisadas

utilizando-se um microscópio óptico Zeiss (Axiovert 200), com aumento máximo de 2560 vezes.

O sistema de classificação utilizado foi o de van den Hoek *et al.* (2005) e a identificação das algas foi feita até o nível taxonômico mais detalhado possível, consultando a literatura especializada (Komárek & Fott, 1983; Anagnostidis & Komárek, 1989; Komárek & Anagnostidis, 1999 e 2005; Bicudo & Menezes, 2005).

### 3.6.2. Quantitativa

Para a análise quantitativa do fitoplâncton, 90 mL de amostra foram coletados dos fotobiorreatores, a cada 5 dias, e as amostras foram fixadas com solução de Lugol ácida. As populações de microalgas foram contadas sob microscópio invertido da marca Zeiss, com magnificação de 400 vezes de acordo com Utermöhl (1958).

Dependendo da concentração de organismos, amostras variando entre 10 e 50 mL foram sedimentadas por no mínimo 3 horas (Wetzel & Likens, 1991). Os indivíduos (células, colônias, coenobia e filamentos) foram contados em campos aleatórios e as densidades calculadas de acordo com APHA (2005) e expressas em células por mililitro.

### 3.7. Análise Microbiológica

Amostras para análise de coliformes (total e *Escherichia coli*) foram obtidas de cada fotobiorreator em dias alternados e quantificadas até as colônias formadas não serem mais detectadas. As amostras foram diluídas em solução PBS (solução salina tamponada com fosfato) até a escala decimal  $10^{-3}$ . O volume de 1 mL de cada diluição

foi inoculado em duplicata em placas de Petri descartáveis e estéreis pelo método de *Pour Plate* (APHA, 2005), usando meio de cultura Cromocult® Coliform Agar (Merck KGaA, Germany). Em seguida, foram incubadas em estufa a 36 °C por 24 h, no escuro. As colônias de coliformes totais e *E. coli* foram contadas e os resultados expressos como unidades formadoras de colônias por volume (UFC/mL).

### **3.8. Análise Estatística**

Os resultados foram analisados por meio de Teste *t* para comparar os valores médios obtidos a partir dos bioensaios aerado e não aerado. Para análise dos resultados dentro de cada bioensaio, utilizou-se ANOVA (software PaSt 3.0, Hammer *et al.*, 2001).

#### 4. RESULTADOS

As variações de pH nos fotobiorreatores podem ser vistas na Figura 6 em função do tempo experimental. Observa-se a manutenção do pH entre 8,5 e 9,5, durante cerca de 18 dias de incubação, decaindo para próximo de 6,0 até o final do experimento (30º dia). Não houve diferenças significativas entre os bioensaios aerado e não aerado ao longo do tempo experimental ( $p > 0,05$ ).

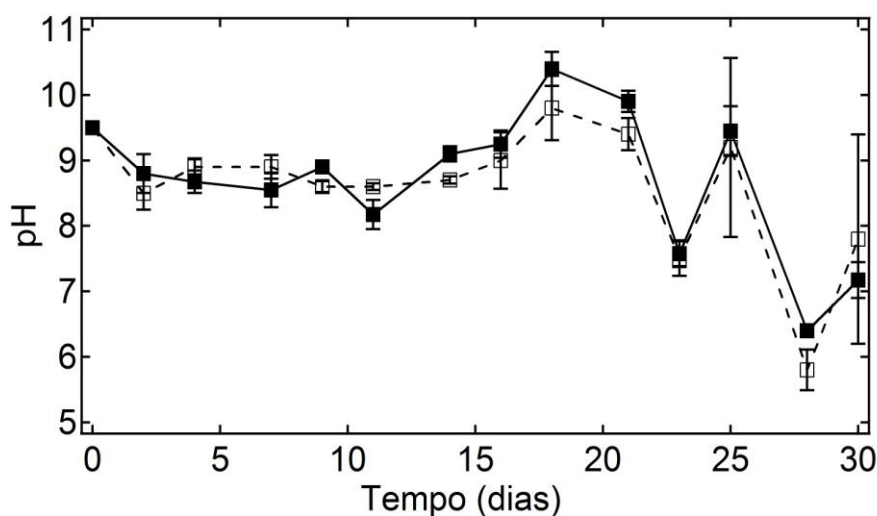


Figura 6 – Variação nos valores de pH nos fotobiorreatores em função do tempo experimental nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerado (quadrados vazios).

Na Figura 7 observa-se a variação da concentração de clorofila *a* nos fotobiorreatores durante o período experimental. Houve aumento exponencial da comunidade de microalgas desde o 1º dia de incubação no bioensaio não aerado, enquanto que no aerado foi detectada uma fase de adaptação do 1º ao 5º dia de incubação, quando então este bioensaio passou a apresentar crescimento exponencial do fitoplâncton. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quanto à concentração de clorofila *a* para os dias 5, 25 e 30 foram obtidas.

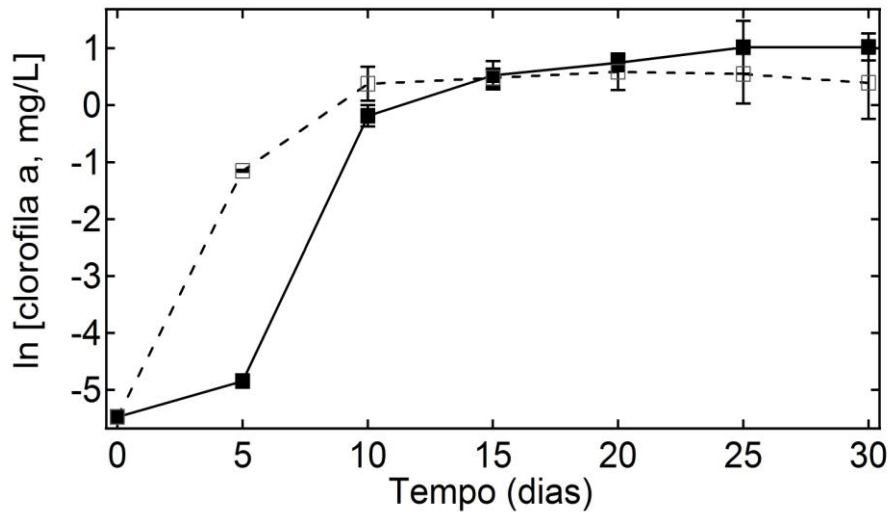


Figura 7 - Variações da concentração de clorofila  $\alpha$  (mg/L) apresentada em log natural (ln) nos fotobiorreatores em função do tempo experimental nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerado (quadrados vazios).

A Tabela 2 apresenta os resultados da determinação da concentração de nutrientes na amostra inicial e ao final de 30 dias de incubação para os bioensaios, aerado e não aerado. No tratamento aerado houve redução nos valores de todos os nutrientes em relação ao inicial, entretanto no bioensaio não aerado houve aumento da concentração de nitrito, nitrato e amônio, enquanto os demais nutrientes também tiveram seus valores reduzidos.

Tabela 2 – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) da concentração de nutrientes ( $\mu\text{g/L}$ ) em amostra inicial e no final do experimento (bioensaio aerado e não aerado). NTK = nitrogênio total Kjeldahl.

<b>Nutriente</b> <b>(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Inicial</b>	<b>Aerado</b>	<b>Não Aerado</b>
Nitrito	23,69	7,53 ( $\pm 2,23$ )	764,03 ( $\pm 124,5$ )
Nitrato	79,64	36,73 ( $\pm 0,29$ )	8950,67 ( $\pm 2203,94$ )
Amônio	13,05	5,86 ( $\pm 2,36$ )	144,98 ( $\pm 32,45$ )
NTK	30330,00	2570,00 ( $\pm 0,00$ )	18790,00 ( $\pm 6550,0$ )
Fósforo Total	2387,10	1699,58 ( $\pm 276,18$ )	2250,58 ( $\pm 201,17$ )
Fosfato	1342,90	78,19 ( $\pm 17,63$ )	1062,00 ( $\pm 154,11$ )
Fósforo Total Dissolvido	1464,80	530,74 ( $\pm 52,75$ )	1196,48 ( $\pm 137,67$ )

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de redução dos nutrientes nos bioensaios aerado e não aerado, considerando os valores inicial e final da Tabela 2. Observa-se que a redução de nutrientes foi maior no bioensaio aerado do que no não aerado, sendo expressivas as reduções de nitrogênio total orgânico (NTK) e fosfato. Também é observado que a concentração dos íons nitrito, nitrato e amônio não sofreram reduções no bioensaio não aerado.

Tabela 3 – Porcentagem (%) de redução da concentração dos nutrientes nos bioensaios aerado e não aerado em relação com a concentração inicial no efluente secundário.

<b>Nutriente</b>	<b>Aerado</b>	<b>Não Aerado</b>
Nitrito	68	S.R.*
Nitrato	54	S.R.*
Amônio	45	S.R.*
NTK	92	38
Fósforo Total	29	21
Fosfato	94	18
Fósforo Total Dissolvido	64	6

\*S.R. = sem redução



A composição taxonômica e a frequência de cada táxon encontrado ao longo do período experimental são apresentadas nas Tabelas 4 e 5 para os bioensaios aerado e não aerado, respectivamente. Foi observada dominância de algas verdes, classe Chlorophyceae em ambos os bioensaios, sendo que a espécie *Chlorella vulgaris* foi a espécie que se destacou durante todo o período experimental, chegando a mais de 99% de presença em ambos os bioensaios.

Outros táxons pertencentes à classe Chlorophyceae também foram observados, porém em abundância relativa de aproximadamente 1,8%, (*Chlamydomonas* sp), e de cerca de 0,01 até aproximadamente 0,05% para os organismos *Scenedesmus acuminatus*, *Oocystis* sp, *Desmodesmus quadricauda* e *Desmodesmus* sp.

Tabela 4 – Bioensaio aerado. Composição taxonômica e abundância relativa de microalgas por dia de amostragem reportada em porcentagem (%) dos táxons durante o período experimental, com amostragens nos dias 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30.

Tempo (dias)	1	5	10	15	20	25	30
<b>Chlorophyceae</b>							
<i>Chlorella vulgaris</i>	97,90	62,50	99,70	99,60	99,60	99,60	99,30
<i>Chlamydomonas</i> sp	-	1,83	0,18	0,33	0,23	0,23	0,47
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	-	-	-	0,33	0,01	0,05	0,04
<i>Desmodesmus</i> sp	-	-	-	0,01	-	0,01	-
<i>Oocystis</i> sp	-	-	-	-	0,04	0,03	0,10
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	-	-	-	0,02	0,02	-	0,04
<b>Cyanophyceae</b>							
<i>Pseudanabaena</i> sp1	-	35,80	0,09	-	-	-	-
<i>Pseudanabaena</i> sp2	-	0,28	-	-	-	-	-
<i>Spirulina</i> sp	-	0,71	-	-	-	-	-

<b>Chrysophyceae</b>							
Alga não identificada (sp ni)	-	-	-	0,01	0,03	0,06	0,01
<b>Euglenophyceae</b>							
<i>Euglena</i> sp	2,10	-	-	-	-	-	-
<b>Bacillariophyceae</b>							
<i>Navicula</i> sp	-	0,01	0,04	-	-	-	-

Tabela 5 – Bioensaio não aerado. Composição taxonômica e abundância relativa de microalgas por dia de amostragem reportada em porcentagem (%) dos táxons durante o período experimental, com amostragens nos dias 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>30</b>
<b>Chlorophyceae</b>							
<i>Chlorella vulgaris</i>	97,90	87,30	99,40	99,30	99,80	99,90	99,90
<i>Chlamydomonas</i> sp	-	-	0,29	0,32	0,20	0,10	0,07
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	-	-	-	-	-	-	0,01
<i>Oocystis</i> sp	-	-	-	-	-	-	0,01
<b>Cyanophyceae</b>							
<i>Pseudanabaena</i> sp1	-	12,70	0,30	0,39	-	-	-
<b>Euglenophyceae</b>							
<i>Euglena</i> sp	2,10	-	-	-	-	-	-

Microalgas da classe Cyanophyceae foram encontradas com frequências de no máximo 36%, sendo *Pseudanabaena* sp1 observada em ambos os bioensaios, enquanto *Pseudanabaena* sp2 e *Spirulina* sp somente no bioensaio aerado. A classe Euglenophyceae (*Euglena* sp) foi detectada somente no 1º dia de análise, em ambos os

bioensaios, enquanto as classes Chrysophyceae e Bacillariophyceae (*Navicula* sp) ocorreram somente no bioensaio aerado e em porcentagens reduzidas.

As Figuras 8 e 9 (densidade celular em função do tempo experimental) mostram que as maiores densidades foram da classe Chlorophyceae, a qual esteve presente durante todo o período experimental em ambos os bioensaios. A classe Cyanophyceae foi detectada a partir do 5º dia, permanecendo por mais tempo no bioensaio não aerado (15º dia) e não sendo detectada no bioensaio aerado a partir do 10º dia. As classes Chrysophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae estiveram presentes em quantidades mínimas e por isso foram agrupadas dentro de *outros grupos*. A classe Euglenophyceae foi observada em ambos os bioensaios, enquanto as classes Chrysophyceae e Bacillariophyceae somente no bioensaio aerado.

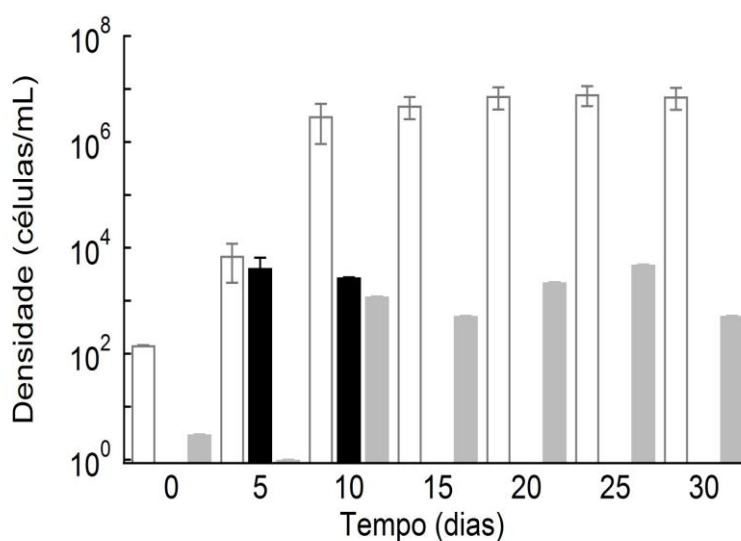


Figura 8 - Densidade de grupos fitoplanctônicos (células/mL) no bioensaio aerado ao longo do tempo experimental. Colunas brancas representam a classe Chlorophyceae, as pretas a classe Cyanophyceae, e as cinzas *Outros Grupos* (classes Chrysophyceae, Euglenophyceae e Bacillariophyceae).

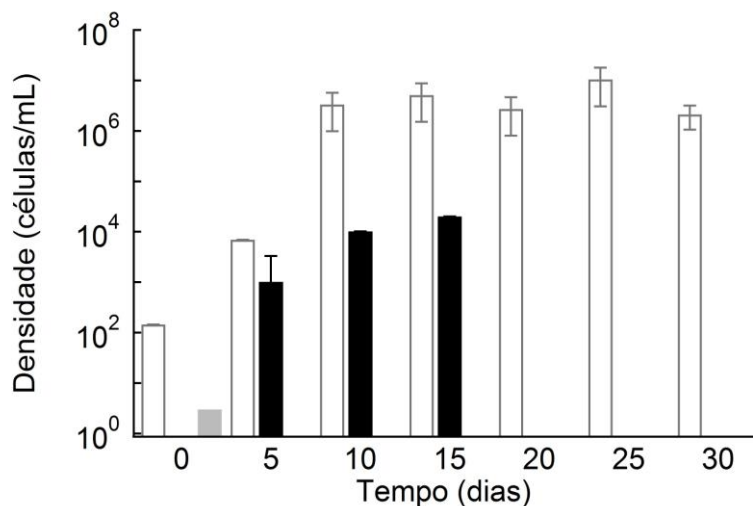


Figura 9 - Densidade de grupos fitoplanctônicos (células/mL) no bioensaio não aerado ao longo do tempo experimental. Colunas brancas representam a classe Chlorophyceae, as pretas a classe Cyanophyceae e a cinza *Outros Grupos* (classe Euglenophyceae).

Os resultados obtidos para as bactérias do grupo coliformes são apresentados nas Figuras 10 (coliformes totais) e 11 (*E. coli*). Unidades formadoras de colônias de coliformes totais deixaram de ser detectadas a partir do 18º dia, enquanto *E. coli* a partir do 11º dia, independente do bioensaio.

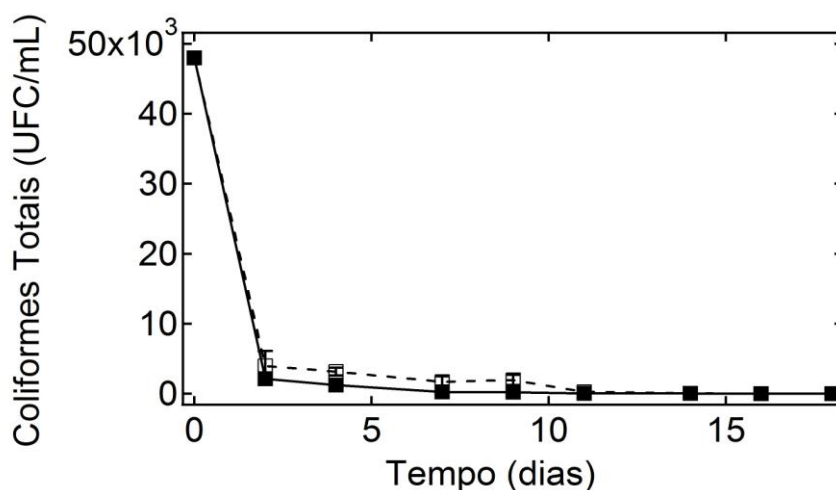


Figura 10 - Densidade de coliformes totais nos bioensaios aerado (quadrados cheios) e não aerado (quadrados vazios) ao longo do período experimental reportada em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

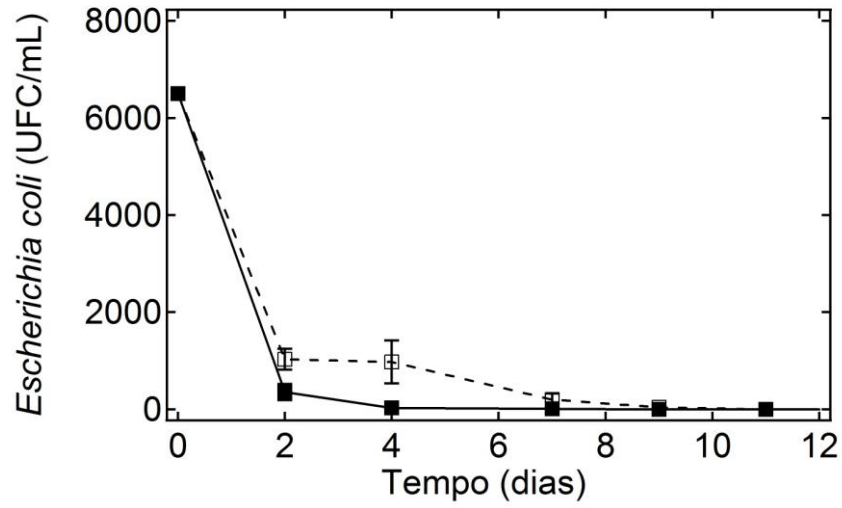


Figura 11 - Densidade de *Escherichia coli* nos bioensaios aerado (quadrados cheiros) e não aerado (quadrados vazios) ao longo do tempo experimental reportada em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

## 5. DISCUSSÃO

A variação do pH no meio observada durante os experimentos tem seu fundamento em atividades de micro-organismos. Segundo Jeris *et al.* (1965) e Weimer *et al.* (1978), o pH alcalino ao início dos experimentos pode ser devido à metanogênese ocorrida na fase final do tratamento anaeróbio. Segundo esses autores, os gêneros *Methanosarcina* e *Methanosaeta* convertem os íons  $H^+$  e os ácidos orgânicos produzidos nas fases anteriores (acidogênese e acetogênese), em  $CH_4$ ,  $HCO_3^-$  e  $H_2O$ . A elevação do pH e sua manutenção durante os experimentos tem como co-responsável a fotossíntese algal, que através da fixação de carbono inorgânico, leva ao aumento do pH (Reynolds, 2006).

A redução do pH ao final do experimento para ambos os bioensaios pode ser reflexo tanto da ausência de crescimento algal a partir do 11º dia experimental, como também de eventuais processos de decomposição microbiana no efluente, como discutido em von Sperling (1996), Arauzo *et al.* (2000), Bitton (2005), Amengual-Morro *et al.* (2012).

Kayombo *et al.* (2002) afirmam que em sistemas de tratamento terciário com microalgas, o pH pode ser usado como indicador da performance do sistema, onde pH acima de 8,0 seria resultado da taxa fotossintética que demanda mais gás carbônico do que as quantidades que são repostas pela respiração dos organismos e pela decomposição bacteriana; pH abaixo de 8,0 indica que a fotossíntese está sendo insuficiente para utilizar todo o gás carbônico produzido. Portanto, a manutenção do pH próximo de 8,0 confirma atividade fotossintética das microalgas.

O crescimento fitoplanctônico obtido em ambos os bioensaios, aerado e não aerado, resultou no aumento de clorofila *a*. A fase de adaptação inicial observada na curva de crescimento no bioensaio aerado também foi encontrada nos resultados de

Bernal *et al.* (2008), que observaram uma fase de adaptação das microalgas até o 8º dia quando cultivando microalgas em efluente de tratamento de esgoto, e do 8º até o 20º e 22º dias, obtiveram crescimento exponencial das microalgas. De acordo com Hammouda *et al.* (1995), Villaverde (2004) e Weismann *et al.* (2007), tratamentos anaeróbios de esgoto não removem os nutrientes N e P eficientemente, permanecendo disponíveis para a comunidade fitoplanctônica, suportando o crescimento algal.

A diminuição da concentração de nutrientes no bioensaio aerado em relação à amostra inicial justifica-se pelo fato de que com aeração, o material orgânico presente no meio provavelmente sofreu oxidação pelas bactérias heterotróficas aeróbias e pelo oxigênio introduzido, disponibilizando, assim, os nutrientes. Estes foram, por sua vez, utilizados pelas microalgas e, com isso, suas concentrações foram reduzidas no meio (Cho *et al.*, 2011). A aeração também contribuiu para criar turbulência, fazendo com que as microalgas fossem levadas pelo movimento da aeração por toda a coluna d'água, tendo aumentado a probabilidade de contato com os nutrientes e evitando o sombreamento das microalgas (Larsdotter, 2006). Isso, conseqüentemente, aumenta o crescimento e a produtividade algal. Com aeração contínua, injeta-se, além de oxigênio, o CO<sub>2</sub>, nutriente essencial para as microalgas fotossintetizantes (Fontes *et al.*, 1987; Becker, 1994) que o incorporam na forma de carboidratos. O oxigênio é utilizado pelas bactérias na degradação da matéria orgânica de micro-organismos mortos, liberando ainda mais nutrientes para o uso pelas microalgas, explicando, assim, a maior redução dos nutrientes no bioensaio aerado em comparação ao não aerado.

A concentração de nitrogênio foi reduzida graças à somatória de processos que ocorreram simultaneamente devido ao borbulhamento: nitrificação, consumo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pelas microalgas e eliminação do N-NH<sub>3</sub> para a atmosfera (Zhang *et al.*, 2011; Ray *et al.*, 2012). Processos combinados de nitrificação-denitrificação têm sido considerados

os métodos mais comuns de remoção de nitrogênio de efluentes e atribui-se cada um destes mecanismos a diferentes grupos de bactérias (Albuquerque *et al.*, 2012).

A fase de adaptação durante o crescimento das microalgas observada no bioensaio aerado pode ser devida à aeração, que pode ter provocado alterações na estrutura abiótica do sistema. Esse resultado também foi observado por Zhang *et al.* (2011). No entanto, segundo Tappe *et al.* (1999) e Paredes *et al.* (2007), a concentração do nitrato também pode levar à fase de adaptação observada. Esses autores reportam que a oxidação de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  não é ativada imediatamente após a aeração, devido à manutenção da demanda de energia pelas bactérias oxidadoras e não oxidadoras de amônio, que também teria apresentado uma fase de adaptação. Com isso, a concentração inicial de  $\text{NO}_3^-$  seria menor do que após a oxidação do  $\text{NO}_2^-$  ter início, fato que poderia ser responsável pelo retardo da fase exponencial. No entanto, no bioensaio não aerado, o crescimento foi exponencial desde o início, mostrando que provavelmente esta explicação não se aplica ao presente estudo. Isso reforça que foi, fundamentalmente, a alteração nas condições ambientais impostas pela aeração que ocasionou o retardo da fase exponencial de crescimento.

No bioensaio não aerado, houve um grande aumento na concentração dos nutrientes  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no final do experimento em relação à amostra inicial. Pode-se, provavelmente, atribuir tal resultado ao metabolismo de bactérias provenientes do tratamento secundário anaeróbio e que continuaram vivas no bioensaio não aerado, as quais atuaram na degradação da matéria orgânica proveniente do tratamento anaeróbio e da decomposição da biomassa algal morta nos últimos dias de experimento. Quanto maior a concentração de matéria orgânica, maior o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, maior a liberação de nutrientes inorgânicos (N e P) no meio (Rodrigues *et al.*, 2005).



Como no bioensaio sem aeração não houve turbulência, as microalgas decantaram e ficaram expostas de modo restrito aos nutrientes, resultando em menor uso dos mesmos e menor densidade celular em relação ao sistema aerado. Assim, os nutrientes liberados como resultado da atividade microbiana foram acumulados e quantificados ao final do bioensaio na forma de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ , resultando em uma concentração maior do que a inicial. Raven (1988), Borowitzka, *et al.* (1998) e Wood, *et al.* (1999) obtiveram decantação significativa em bioensaios não aerados realizados em efluente secundário. Segundo esses autores, a aeração tem a importante função de homogeneização do sistema, exposição das algas à luz, possibilitando a realização da fotossíntese, aumento populacional e consumo dos nutrientes (Larsdotter, 2006). Resultado distinto foi obtido quando o nitrogênio foi quantificado na forma de NTK. Este diminuiu, como esperado, ao final dos experimentos aerado e não aerado.

A redução do fósforo em ambos os bioensaios, mas em maior intensidade no aerado, sugere que este nutriente foi consumido pelas microalgas. Este resultado está de acordo com outros da literatura, que mostraram redução do fosfato em sistemas de tratamento terciário fundamentado em microalgas (Lloyd *et al.*, 2003; Bernal *et al.*, 2008). Segundo de Godos *et al.* (2010), o mecanismo de redução do fósforo parece ser mais complexo do que a remoção de nitrogênio. O fósforo pode ser assimilado em excesso por várias microalgas e algumas bactérias (*luxury consumption*) e armazenado na forma de grânulos de polifosfatos no interior das células (Larsdotter, 2006).

A análise qualitativa da comunidade fitoplanctônica mostrou que as algas observadas são típicas de ambientes com contaminação orgânica (Palmer, 1980, König, 1984; König *et al.*, 2002) e sua diversidade em efluentes é influenciada por fatores como carga orgânica, tempo de retenção hidráulica, temperatura, pH e concentração de nutrientes no efluente (Hosetti & Frost, 1998; Kayombo *et al.*, 2002; Zanotelli *et al.*,

2002; Ahmadi *et al.*, 2005). De acordo com Palmer (1969; 1980) e König (1984), a composição da comunidade fitoplanctônica está fortemente relacionada com a concentração de nutrientes e material orgânico. Conclusão similar pode-se obter do presente estudo, onde se observou maior diversidade de organismos fitoplanctônicos no bioensaio aerado, com menor concentração de nutrientes, enquanto que no bioensaio não aerado, apesar da maior concentração de nutrientes, houve menor diversidade.

Os resultados deste estudo mostraram um predomínio da classe Chlorophyceae em relação às demais, como também observado por Bernal *et al.* (2008) e Palmer (1969). Segundo Palmer (1969) isso se deve à resistência e adaptação das Chlorophyceae a ambientes eutróficos. No presente estudo, a espécie *Chlorella vulgaris* dominou em todos os bioensaios, com aproximadamente 99% de presença em relação às outras microalgas. Este resultado está de acordo com outros da literatura (Chu *et al.*, 2009; Bhatnagar *et al.*, 2010) e, por isso, essa microalga é referida por alguns autores como uma espécie autóctone de efluentes. A menor porcentagem encontrada para as outras microalgas também foi observada em outros trabalhos (König *et al.*, 2002; Tharavathi *et al.*, 2003; Shanthala *et al.*, 2009). Shanthala *et al.* (2009) avaliaram a diversidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização e obtiveram resultados similares; König *et al.* (2002) estudaram lagoas de estabilização no estado da Paraíba e também obtiveram baixa contribuição de táxons que não *Chlorella* sp. Segundo Salomoni (1997), organismos como os da espécie *Chlorella vulgaris*, que sobrevivem em ambientes ricos em nutrientes e materiais orgânicos, apresentam características adaptativas, como o tamanho reduzido e alta taxa de crescimento. Sabe-se que quanto menor o tamanho, maior é a eficiência na absorção e assimilação de nutrientes (r-estrategistas) devido à maior razão superfície/volume. Há evidências de que o trifosfato de sódio, constituinte do detergente sintético e presente em esgotos domésticos,

estímulo o crescimento de *Chlorella vulgaris* (Palmer, 1980 *apud* Granado, 2004). Além disso, estudos em laboratório têm demonstrado que essa microalga produz um antibiótico, a clorelina, com ação bactericida, capaz de inibir o crescimento, a respiração e a fotossíntese de outras algas, além de alterar o metabolismo de protozoários, moluscos, crustáceos e peixes (Pratt, 1944; Ryther, 1954).

O crescimento das Chlorophyceae no efluente mostra a potencialidade desse resíduo para a produção de microalgas. Singh *et al.* (2011) estudaram a viabilidade do uso de efluentes como meio de cultura para microalgas destinadas à produção de ração animal e biocombustíveis, inoculando *Chlorella* sp e *Scenedesmus* sp em efluente municipal e obtiveram resultados promissores, assim como os que obtivemos no presente estudo.

A classe Cyanophyceae é resistente à poluição, a ambientes anaeróbios e efluentes com alta carga orgânica (Ahmadi *et al.*, 2005; Komárek & Anagnostidis, 2005; Tucci *et al.*, 2006; Escorihuela *et al.*, 2007). A presença de apenas cerca de 37% pode estar relacionada à elevada turbidez, que desfavorece o grupo das Cyanophyceae, principalmente daquelas fixadoras de N<sub>2</sub> (Havens *et al.*, 2004). A razão N:P também é um aspecto a ser considerado quando se discute a presença/ausência desse grupo de algas. Segundo Pearsall (1930) e Arauzo *et al.* (2000), a razão N:P em efluentes anaeróbios não é favorável às Cyanophyceae. De acordo com Havens *et al.* (2004), razões N:P < 29 favorecem o domínio de organismos da classe Cyanophyceae, enquanto que razões N:P > 29 favorecem outras classes. Considerando os valores de nitrogênio total (30,4 mg/L) e fósforo total (2,4 mg/L) quantificados na amostra inicial, imediatamente antes do início dos experimentos, a razão N:P no efluente anaeróbio deste estudo foi de 12,7, o que poderia ser considerado favorável às Cyanophyceae. No entanto, o observado foi o domínio da classe Chlorophyceae. Em nosso caso, a turbidez

elevada do efluente, e não a razão N:P pode ter inibido o desenvolvimento das Cyanophyceae. Farina (2011), estudando a dinâmica populacional de microalgas em efluente secundário de tratamento aeróbio, encontrou dominância de Cyanophyceae, além de maior variedade de grupos fitoplanctônicos do que o observado no presente estudo. Segundo esse autor, isso foi uma consequência das baixas razões N/P encontradas nos efluentes de tratamento aeróbio, fato também observado por Ahmadi *et al.* (2005) e Bernal *et al.* (2008). *Pseudanabaena* sp foi o gênero de cianobactérias mais abundante no presente trabalho e foi visualizado em ambos os bioensaios. Essa microalga é não-fixadora de N<sub>2</sub> e comum em ambientes eutróficos, dominantes em efluentes da indústria de papel e celulose (Kirkwood *et al.*, 2003; Wehr *et al.*, 2003; Komárek & Anagnostidis, 2005).

No bioensaio aerado, a biomassa de Bacillariophyceae e Chrysophyceae foi baixa em relação às demais classes, principalmente Chlorophyceae assim como nos trabalhos de Mendes *et al.* (1995), Sukias *et al.* (2001), de Paul (2002), Tharavathi *et al.* (2003) e Bernal *et al.* (2008), que também obtiveram raros organismos dessas classes.

Como reportado por Roche (1995), os indivíduos da classe Euglenophyceae são escassos em efluentes com pouca carga orgânica e a presença do gênero *Euglena* sp no 1º dia de amostragem, tanto no bioensaio aerado como no não aerado, pode ser reflexo da matéria orgânica residual presente no efluente, já que essas algas são mixotróficas (Tarlan *et al.*, 2002).

A redução acelerada de coliformes totais e *E. coli* nos dois primeiros dias de incubação e a ausência desses organismos após cerca de 10 dias de incubação foram também observadas em outros estudos (Pearson, 1986; Pearson *et al.*, 1987; Dixo *et al.*, 1995; Hammouda *et al.*, 1995; Rangeby *et al.*, 1996; Davies-Colley *et al.*, 1997; Kiso *et al.*; 2005; Bernal *et al.*, 2008). Hanajima *et al.* (2011) estudaram a ação de diferentes

intensidades de aeração na redução de coliformes e concluíram que a redução ocorre mais rapidamente em altas aerações.

No presente estudo, a presença inicial e a redução de unidades formadoras de colônias nos bioensaios aerado e não aerado sugerem que um tratamento terciário seria de fundamental importância para a saúde do corpo hídrico receptor e daqueles onde esse deságua, já que houve redução bacteriana de  $10^4$  vezes (99,9% dessas bactérias foram reduzidas), enquanto, segundo Kassab *et al.* (2010), em tratamento anaeróbico, a redução de *E. coli* não ultrapassa 10 vezes.

Dados da literatura mostram que a redução dos coliformes deve-se ao efeito que o crescimento das algas exerce no pH do efluente. Amengual-Morro *et al.* (2012) e König (1999) mostraram que a atividade fotossintética de microalgas em efluentes de tratamento de esgoto supera a respiração bacteriana durante o período diurno, levando a um desequilíbrio do pH entre o dia e a noite. Isso tem por consequência a inativação dos coliformes e outras formas bacterianas. Segundo Metcalf & Eddy (2003), há bactérias que não suportam pH acima de 9,5 ou abaixo de 4,0, sendo a faixa ideal de pH entre 6,5 e 7,5.

Além da atividade algal, o tempo de incubação de 30 dias e a baixa profundidade dos biorreatores, propiciando a penetração da luz solar por toda coluna d'água, mesmo considerando a turbidez do efluente, pode ter contribuído para a redução bacteriana (Pearson *et al.*, 1987; von Sperling, 1996; Cavalcanti *et al.*, 2001; Soares, 2002; Cordero *et al.*, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

Do presente estudo, conclui-se que o efluente de tratamento anaeróbio tanto aerado quanto não aerado suportou o crescimento de microalgas autóctones, principalmente da classe Chlorophyceae, em especial da espécie *Chlorella vulgaris*, ao mesmo tempo em que ocorreu a redução das unidades formadoras de colônias de bactérias coliformes (totais e *Escherichia coli*) e redução da concentração de nutrientes, com exceção do bioensaio não aerado. Isso sugere que efluentes de ETE com sistema anaeróbio de tratamento de esgoto possuem elevado potencial para suportar o crescimento de microalgas. Com isso, cria-se a possibilidade de produção de biomassa de microalgas com custo reduzido e a utilização dessa biomassa para diversas aplicações, desde que não seja necessária a pureza do produto final. Utilizando-se o resíduo para gerar biomassa algal, a diminuição do potencial de eutrofização do efluente será obtida e custos de produção poderão ser simultaneamente reduzidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeliovich, A. 2004. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Ed. Richmond, A. Blackwell Publishing. 566p.
- Ahmadi, A.; Riahi, H.; Noori, M. 2005. Studies of the effects of environmental factors on the seasonal change of phytoplankton population in municipal wastewater stabilization ponds. **Toxicological and Environmental Chemistry**, 87 (4): 543-550.
- Aksu, Z. 1998. Biosorption of Heavy Metals by Microalgae in Batch and Continuous Systems. *In*: Wong, Y.S. E Tam, N.F.Y. (Ed.), **Wastewater Treatment with Algae**. Springer-Verlag, 3, pp. 37-54.
- Albuquerque, A.; Makinia, J.; Pagilla, K. 2012. Impact of aeration conditions on the removal of low concentrations of nitrogen in a tertiary partially aerated biological filter. **Ecological Engineering**, 44: 44-52.
- Amengual-Morro, C.; Niell, G.M.; Martínez-Taberner, A. 2012. Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. **Journal of Environmental Management**, 95: 571-576.
- Anagnostidis, K.; Komárek, J. 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes, 4 – Nostocales. **Archiv für Hydrobiologie**, 80 (1-4): 237-472 (Algological Studies 50-53).
- APHA. 2005. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Association, Washington, DC.
- Arauzo, M.; Colmenarejo, M.F.; Martínez, E.; García, M.G. 2000. The role of algae in a deep wastewater self regeneration pond. **Water Research**, 34 (14): 3666-3674.
- Arceivala, S.J. 1981. **Wastewater Treatment and Disposal**. Marcel Dekker, NY, USA.
- Azam, F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. **Science**, 280: 694-696.
- Barbosa, M.J.G.V. 2003. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation**. Wageningen University, 166p.
- Becker, E.W. 1994. **Microalgae, Biotechnology and Microbiology**. Cambridge. Cambridge University Press.
- Bernal, C.C.; Vázquez, G.; Quintal, I.B.; Bussy, A.L. 2008. Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water. **Water, Air and Soil Pollution**, 190: 259-270.

- Bhatnagar, A.; Bhatnagar, M.; Chinnasamy, S. 2010. *Chlorella minutissima* – a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 161: 523-536.
- Bhatnagar, A.; Chinnasamy, S.; Singh, M.; Das, K.C. 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, 88: 3425-3431.
- Bicudo, C.E.M.; Menezes, M. 2005. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições**. Rima, 489p.
- Bitton, G. 2005. **Wastewater Microbiology**, 3rd. Edition, Wiley-Liss, Hoboken, NJ., 746 p.
- Boelee, N.C.; Temmink, H.; Janssen, M.; Buisman, C.J.N.; Wijffels, R.H. 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. **Water Research**, 45: 5925-5933.
- Borowitzka, M.A. 1998. **Limits to growth in wastewater treatment with algae**. Womg, Y.S. and Tam, N.F.Y. Editors. Springer Verlag. P. 203-226.
- Branco, S.M. 1986. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**, São Paulo, 3ª ed. CETESB/ASCETESB, 616p.
- Camargo, A.P.; Alonso, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. **Environment International**, 32: 831-849.
- Cavalcanti, P.F.F.; Mayer, M.G.R.; Moreira, E.A.M.; Vanhaandel, A.C. 2001. Lagoas de polimento para o pós-tratamento de esgotos digeridos – Parte 2 - Remoção de Patógenos. In: CHERNICHARO, C.A.L.; **Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios**. Coletânea de Trabalhos Técnicos. Vol. 2, PROSAB. 1º Edição. Belo Horizonte, SEGRAC Editora, p.79-86.
- Chi, Z.; Zheng, Y.; Jiang, A.; Chen, S. 2011. Lipid production by culturing oleaginous yeast and algae with food waste and municipal wastewater in an integrated process, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 165: 442-453.
- Chistenson, L.; Sims, R. 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts. **Biotechnology Advances**, 29: 686-702.
- Cho, S.; Luong, T.T.; Lee, D.; Oh, Y.K.; Lee, T. 2011. Reuse of effluent water from municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, 102: 8639-8645.
- Chu, W.L.; See, Y.C.; Phang, S.M. 2009. Use of immobilized *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. **Journal of Applied Phycology**, 21: 641-648.



- Cordero, A.; García, M.; Herradora, M.; Ramírez, G.; Martínez, R. 2010. Bacteriological characterization of wastewater samples obtained from primary treatment system on a small scale swine farm. **Bioresource Technology**, 101: 2938-2944.
- Cruz, L.P.V. 1997. **Principais técnicas de tratamento de águas residuais**. *Millenium Online*, Julho, nº7 Ambient.
- Davies-Colley, R.J.; Donnison, A.M.; Speed, D. J. 1997. Sunlight wavelengths in faecal indicator microorganisms in waste stabilization ponds. **Water Science and Technology**, 35: 219-225.
- de Bashan, L.E.; Hernandez, J.P.; Morey, T.; Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Research**, 38: 466-474.
- de Bashan, L.E.; Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: review on practical aspects. **Bioresource Technology**, 101: 1611-27.
- de Godos, I.; Vargas, V.A.; Blanco, S.; Gonzales, B.C.; Soto, R.; Garcia-Encina, P.A.; Becares, E.; Munoz, R. 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggyery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresources Technology**, 101: 5150-5158.
- de La Noüe, J.; Laliberté, G.; Proulx, D. 1992. Algae and wastewater. **Journal of Applied Phycology**, 4: 247-254.
- de Paul, M. 2002. Caracterización biológica de lagunas de estabilización (Jujuy) con diferentes tiempos de retención hidráulico. In: **International development and appropriate Technologies for sewage management and environment**. Buenos Aires: AIDID, Argentinian Association of Sanitation Engineering and Environmental Sciences.
- Derner, R.B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S.M.; Fett, R. 2006. Microalgas: produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, 36(6): 1959-1967.
- Dixo, N.G.H.; Gambrill, M. P.; Catunda, P.F.C.; van Haandel, A.C. 1995. Removal of pathogenic organism from the effluent of an upflow. **Water Science and Technology**, 31(12): 275-284.
- Doran, M.D.; Boyle, W.C. 1979. Phosphorus removal by activated algae. **Water Research**, 13: 805-812.
- Escorihuela, A.; Núñez, M.; Rosales, N.; Mora, R.; Morales, E. 2007. Microalgas presentes em uma laguna para pulimento de efluentes de uma planta de tratamento de águas residuales urbanas. **Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia**, 24(1): 225-230.

- Farina, V.O.A. 2011. **Dinâmica populacional de microalgas em efluente secundário de ETE**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual Paulista, Assis, SP.
- Fontes, A.G.; Vargas, M.A.; Moreno, J.; Guerrero, M.G.; Losada, M. 1987. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. **Biomass**, 13: 33-43.
- Gerba, C.P. 2008. **Biological Wastewater Treatment: principles, modeling and design**. Eds: Henze, M.; van Loosdrecht, M.C.M.; Ekama, G.A.; Brdjanovic, D. IWA Publishing, 511p.
- Girard, J.E. 2010. **Principles of environmental chemistry**. 2<sup>ed</sup>. Jones and Barlett, USA.
- Graham, J.M.; Graham, L.E.; Zulkifly, S.B.; Pflieger, B.F.; Hoover, S.W.; Yoshitani, J. 2012. Freshwater diatoms as a source of lipids for biofuels. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 39: 419-428.
- Granado, D.C. 2004 **Variações nictemerais e sazonais na estrutura da comunidade fitoplanctônica num sistema de lagoas de estabilização (Novo Horizonte, SP)**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 128p.
- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.
- Hammouda, O.; Gaber, A.; Abdel-Raouf, N. 1995. Microalgae and wastewater treatment. **Ecotoxicological and Environment Safety**, 31: 205–210.
- Hanajima, D.; Fukumoto, Y.; Yasuda, T.; Suzuki, K.; Maeda, K.; Morioka, R. 2011. Bacterial community dynamics in aerated cow manure slurry at different aeration intensities. **Journal of Applied Microbiology**, 111: 1461-1425.
- Harrison, R.M. 1996. **Pollution: causes, effects and control**. 3<sup>rd</sup> ed. The Royal Society of Chemistry, 480p.
- Havens, K.E.; James, R.T.; East, T.L. Smith, V.H. 2004. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. **Environmental Pollution**, 122: 379-390.
- Hoffmann, J.P. 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **Journal of Phycology**, 34: 757-753.
- Hosetti, B.; Frost, S. 1998. A review of the control of biological water treatment in stabilization ponds. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 28(2): 193-218.

- Jeris, J.S.; McCarty, P.C. 1965. Biochemistry of methane fermentation using  $^{14}\text{C}$  tracers. **Journal WPCF**, 37: 178-192.
- Kassab, G.; Halalsheh, M.; Klapwijk, A.; Fayyad, M.; van Lier, J.B. 2010. Sequential anaerobic-aerobic treatment for domestic wastewater – A review. **Bioresource Technology**, 101: 3299-3310.
- Kayombo, S.; Mbwette, T.S.A.; Mayo, A.W.; Katima, J.H.Y.; Jogensen, S.E. 2002. Diurnal cycles of variation of physical-chemical parameters in waste stabilization ponds. **Ecological Engineering**, 18: 287-291.
- Kirkwood, A.E.; Nalewajko, C.; Fulthorpe, R.R. 2003. Physiological characteristics of cyanobacteria in pulp and paper waste-treatment systems. **Journal of Applied Phycology**, 15: 325-335.
- Kiso, Y.; Jung, Y.J.; Park, M.S.; Wang, W.; Shimase, M.; Yamada, T.; Min, K.S. 2005. Coupling of sequencing batch reactor and mesh filtration: operational parameters and wastewater treatment performance. **Water Research**, 39: 4887-4898.
- Koivunen, J.; Heinonen-Tanski, H. 2005. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments. **Water Research**, 39: 1519-1526.
- Komárek, J.; Fott, B. 1983. Das phytoplankton des Süßwasser. **Systematik und Biologie**. Chlorophyceae, Chlorococcales. Stuttgart, 1044p.
- Komárek, J.; Anagnostidis, K. 1999. Clroococcales. In: Ettl, A., Gerloff, J., Heynig, H., Mollenhauer, D. (Eds.) **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Bd 19. Stutgard, G. Fischer Verlag, 548p.
- Komárek, J.; Anagnostidis, K. 2005. Oscillatoriales. In: B Büdel, G. Gartner, L. Krienitz and M. Schagel (HRSRG.). **Süßwasserflora von Mitteleuropa**. Bd 19/2, 758p.
- König, A. 1984. **Ecophysiological studies on some algae and bacteria of waste stabilization ponds**. PhD Thesis. University of Liverpool. Liverpool.
- König, A. 1990. Biologia das lagoas. Algas. In: Mendonça, S.R. **Lagoas de estabilização e aeradas mecanicamente: novos conceitos**. João Pessoa, 385p.
- König, A.; Souza, M.S.M.; Costa, N.A.F.; Freitas, V.L.B.; Ceballos, B.S.O. 1999. Variação nictemeral da qualidade do efluente final de uma lagoa facultativa secundária e a influência das algas. In: **20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro. 118: 187.
- König, A.; Ceballos, B.S.O.; Almeida, M.V.A. 2002. Observações sobre a população algal em efluentes de lagoas de estabilização em escala real no estado da

Paraíba. In: **Anais do XXVIII Congresso Internacional de Engenharia Sanitária y Ambiental**. Cancun, México.

- Larsdotter, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. **VATTEN**, 62: 31-38.
- Lloyd, B.J.; Leither, A.R.; Vorkas, C.A.; Gugescharajah, R.K. 2003. Under-performance and rehabilitation strategy for waste stabilization ponds in Mexico. **Water Science and Technology**, 48(2): 35-43.
- López-Rodas, V.; Maneiro, E.; Costas, E. 2006. Adaptation of cyanobacteria and microalgae to extreme environmental changes derived from anthropogenic pollution. **Limnetica**, 25(1-2): 403-410.
- Luostarinen, S.; Luste, S.; Valentín, L.; Rintala, J. 2006. Nitrogen removal from on-site treated anaerobic effluents using intermittently aerated moving bed biofilm reactors at low temperatures. **Water Research**, 40: 1607-1615.
- Magnoli, D. & Araújo, R. 2005. **Geografia: a construção do mundo**. São Paulo, Ed. Moderna.
- Maier, R.M; Pepper, I.L.; Gerba, C.P. 2009. **Environmental Microbiology**. 2ª ed. Academic Press. 598p.
- Mara, D.; Pearson, H. 1998. Lagoon technology international. **Design manual for waste stabilization ponds in Mediterranean countries**. England, Leeds.
- Mara, D.; Horan, N. 2003. **Handbook of water and wastewater microbiology**. University of Leeds, UK. 621p.
- Mayo, A.W.; Noike, T. 1994. Effect of Glucose Loading on the Growth Behavior of *Chlorella vulgaris* and Heterotrophic Bacteria in Mixed Culture. **Water Research**, 28: 1001-1008.
- McGriff, E.C.; McKinney, R.E. 1972. The removal of nutrients and organics by activated algae. **Water Research**, 6: 1155-1164.
- Meiring, P.; Rose, P.; Shipin, O. 1994. **Algal Aid Puts a Sparkle on Effluent**. WQI, 2.
- Mendes, B.; Lapa, N.; Morais, J.; do Nascimento, J.; Pereira, M.; Oliveira, J.S. 1995. Statistical relationships between biological populations and organic matter in a waste stabilization pond system (WPS). In: **Third IAWQ International specialist conference and workshop waste stabilization ponds technology and applications**. London: International Association on Water Quality.
- Mesple, F.; Casellas, C.; Troussellier, M.; Bontoux, J. 1996. Modelling orthophosphate evolution in a high rate algal pond. **Ecology Modeling**, 89(1-3):13-21.

- Metcalf & Eddy, Inc. 2003. **Wastewater Engineering, Treatment, Disposal and Reuse**, McGraw-Hill, Inc.
- Monarca, S.; Feretti, D., Collivignarelli, C.; Guzzella, L.; Zerbini, I.; Bertanza, G.; Pedrazzani, R. 2000. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, 34: 4261-4269.
- Morgenroth, E. 2008. **Biological Wastewater Treatment: principles, modeling and design**. Eds: Henze, M.; van Loosdrecht, M.C.M.; Ekama, G.A.; Brdjanovic, D. IWA Publishing. 511p.
- Moshiri, G.A. 1993. **Constructed Wetlands for Water Quality Improvement**. Lewis Publishers. 632p.
- Odum, E.P.; Barrett, G.W. 2007. **Fundamentos de Ecologia**. CENGAGE Learning. 612p.
- Olguín, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. **Biotechnology Advances**, 22: 81-91.
- Olguín, E.J. 2012. Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. **Biotechnology Advances**, 30: 1031-1046.
- Oliveira, M.F.; Pilz, E.B.; Bellincanta, G.S.; Limberger, N.; Macedo, N.T.; Corção, G.; Germani, J.C.; van der Sand, S.T. 2006. Avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização através da identificação de população bacteriana. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34: 31-37.
- Oswald, W.J. 1988a. Large scale culture systems: engineering aspects. In: Borowitzka M, Borowitzka L, editors. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, p. 357–92.
- Oswald, W.J. 1988b. Microalgae and wastewater treatment. In: Borowitzka, L.J. (Ed). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, 12, pp. 305-328.
- Oswald, W.J. 1988c. **The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation, in Algae and human affairs**, C.A. Lembi e J.R. Waaland, Editors. Cambridge University Press: Cambridge. P. 255-281.
- Palmer, C.M. 1969. Composite Rating of Algae Tolerating Organic Pollution. **Journal of Phycology**, 5: 78-82.
- Palmer, C.M. 1980. The identification, significance, and control of algae in water supplies and in polluted water. In: **Algae and Water Pollution**. Castle House Publications Ltd, UK, 123 pp.

- Paredes, D.; Kusch, P.; Mbwette, T.; Stange, F.; Müller, R.; Köser, H. 2007. New aspects of microbial nitrogen transformations in the context of wastewater treatment – a review. **Engineering Life Science**, 7(1): 13-25.
- Park, J.B.K.; Craggs, R.J.; Shilton, A.N. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, 102: 35-42.
- Pearsall, W.H. 1930. Phytoplankton of English lakes, I. The proportion in the water of some dissolved substances of biological importance. **Journal of Ecology**, 18(2): 306-320.
- Pearson, H.W. 1986. Estimation of chlorophyll-a as a measure of algae biomass in waste stabilization ponds. In: **Proceedings of the regional Seminar on the Waste Stabilization Pond Research**, 3-7 March. Pan American Center for Sanitary Engineering and Environment Sciences, Lima.
- Pearson, H.W., Mara, D.D., Mills, S.W., Smallman, D.J. 1987. Physico-chemical parameters influencing faecal bacterial survival in waste stabilization ponds. **Water Science & Technology**, 19(12): 145-152.
- Pittman, J.K.; Dean, A.P.; Osundeko, O. 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resoucers. **Bioresource Technology**, 102: 17-25.
- Pratt, R. 1944. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. **Science**, 99: 351-352.
- Proulx, D.; Lessard, P.; de la Noüe, J. 1994. Tertiary treatment of secondarily treated urban wastewater by intensive cultura of *Phormidium bohneri*. **Environmental Technology**, 15(5): 449-458.
- Rangeby, M., Johansson, P., Pernup, M. 1996. Removal of fecal coliforms in a wastewater stabilization pond. **Water Science and Technology**, 34(11): 149-157.
- Raven, J.A. 1988. Limits to growth, in **Micro-algal biotechnology**, Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. Editors. Cambridge University Press: Cambridge. P. 331-356
- Rawat, I.; Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, 88: 3411-3424.
- Ray, R.; Henshaw, P.; Biswas, N. 2012. Effects of reduced aeration in a biological aerated filter. **Canadian Journal of Civil Engineering**, 39: 432-438.
- Reynolds, C. 2006. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge University Press. 535p.

- Richmond, A. 1990. **Progress in Phycological Research**, Round/ Chapman eds., Biopress Ltda., 7: 1-62.
- Richmond, A. 2004. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Science Ltd. Blackwell.
- Roche, K.F. 1995. Growth potential of *Daphnia magna* Straus in the water of dairy waste stabilization ponds. **Water Research**, 32: 1352-1328.
- Rodrigues, A.Q.; van Haandel, A.; Cavalcanti, P.F.F. 2005. Caracterização das bactérias heterotróficas de sistemas de lodo ativado, geradas a partir de esgoto bruto e esgoto digerido. In: **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Campo Grande.
- Ryther, J.H. 1954. Inhibitory effects of phytoplankton upon the feeding of *Daphnia magna* with reference to growth, reproduction and survival. **Ecology**, 35: 522-533.
- Salomoni, S.E. 1997. **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.
- Shanthala, M.; Hosmani, S.P.; Hosetti, B.B. 2009. Diversity of phytoplankton in a waste stabilization pond at Shimoga Town, Karnataka State, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, 151: 437-443.
- Singh, M., Reynolds, D.L., Das, K.C. 2011. Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, 102: 10841-10848.
- Soares, A.M.E. 2002. **Avaliação de um sistema em escala piloto, reator UASB – Lagoa de polimento com chicanas e sem chicanas**. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia da UFMG.
- Soldatelli, V.F. 2007. **Avaliação da comunidade fitoplanctônica em lagoas de estabilização utilizadas no tratamento de efluentes domésticos. Estudo de caso – ETE – UCS**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia. Instituto de Biociências. UFRGS. Porto Alegre, RS. 182p.
- Stottmeister, U.; Wießner, A.; Kusch, P.; Kappelmeyer, U.; Kästner, M.; Bederski, O.; Müller, R.A.; Moormann, H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, 22: 93-117.
- Sukias, J.P.S.; Tanner, C.C.; Davies-Colley, R.J.; Nagels, J.W.; Wolters, R. 2001. Algal abundance, organic matter and physico-chemical characteristics of dairy farm facultative ponds: implications for treatment performance. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 44(4): 279-296.

- Tappe, W.; Lavermann, A.; Bohland, M.; Braster, M.; Rittershaus, S.; Groeneweg, J.; van Verseveld, H.W. 1999. Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* cultivated in a retentostat with complete biomass retention. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 2471-2477.
- Tarlan, E.; Dilek, F.B.; Yetis, U. 2002. Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. **Bioresource Technology**, 8: 1-5.
- Tharavathi, N.C.; Hosetti, B.B. 2003. Biodiversity of algae and protozoa in a natural waste stabilization pond: a field study. **Journal of Environmental Biology**, 24(2): 193-199.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. 2006. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup>ed. Artmed. 826p.
- Trejo, A.; de Bashan, L.E.; Hartmann, A.; Hernandez, J.P.; Rothballer, M.; Schmid, M.; Bashan, Y. 2012. Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growth-promoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. **Environmental and Experimental Botany**, 75: 65-73.
- Tucci, A.; Sant'Anna, C.L.; Gentil, R.G.; de Paiva-Azevedo, M.T. 2006. Fitoplâncton do Lago das Garças, São Paulo, Brasil: um reservatório urbano eutrófico. **Hoehnea**, 33(2): 147-175.
- Tundisi, J.G.; Tundisi, T.M. 2008. **Limnologia**. Oficina de Textos, 631p.
- Tyagi, R.D.; Vembu, K. 1990. **Wastewater Treatment by Immobilized Cells**. CRC Press. 281p.
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommnung der quantitative phytoplankton-methodik. **Mitt Internat Ver Linnol**, 9: 1-38.
- van den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. 2005. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, 627p.
- van Lier, J.B.; Mahmoud, N.; Zeeman, G. 2008. **Biological Wastewater Treatment: principles, modeling and design**. Eds: Henze, M.; van Loosdrecht, M.C.M.; Ekama, G.A.; Brdjanovic, D. IWA Publishing. 511p.
- Villaverde, S. 2004. Recent developments on biological nutrient removal processes for wastewater treatment. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, 3: 171-183.
- von Sperling, M. 1996. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias – lagoas de estabilização**. vol 3, DESA-UFMG, Belo Horizonte.



- Wehr, J.D.; Sheath, R.G. (Eds.). 2003. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. Amsterdam: Academic Press.
- Weimer, P.J.; Zeikus, J.G. 1978. Acetate metabolism in *Methanosarcina barceri*. **Archieve of Microbiology**, 119: 175-182.
- Wetzel, R.G., Likens, G.E. 1991. **Limnological analysis**. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 357 pp.
- Wetzel, R.G. 2001. **Limnology**. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press, San Diego, CA. 1006p.
- Wiesmann, U.; Choi, I.S.; Dombrowski, E.M. 2007. **Fundamentals of biological wastewater treatment**. Weinheim: Wiley, 361 pp.
- Wood, B.J.B.; Grimson, P.H.K.; German, J.B.; Turner, M. 1999. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. **Journal of Biotechnology**, 70(1-3): 175-183.
- Zanetti, F.; De Luca, G.; Sacchetti, R. 2006. Microbe removal in secondary effluent by filtration. **Annals of Microbiology**, 56(4): 313-317.
- Zanotelli, C.; Peres, A.; Perdomo, C.; Ribeiro, R. 2002. Identificação de algas e clorofila a em lagoas facultativas no tratamento de dejetos suínos. In: **Environmental Challenges of the Globalization**. Vitoria: AIDIS, Brazilian Association of Sanitation and Environmental Engineering.
- Zhang, C.M.; Mao, Z.G.; Wang, X.; Zhang, J.H.; Sun, F.B.; Tang, L. 2010. Effective ethanol production by reutilizing waste distillage anaerobic digestion effluent in an integrated fermentation process coupled with both ethanol and methane fermentations. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 33: 1067-1075.
- Zhang, M.; Lawlor, P.G.; Wu, G.; Lynch, B.; Zhan, X. 2011. Partial nitrification and nutrient removal in intermittently aerated sequencing batch reactors treating separated digestate liquid after anaerobic digestion of pig manure. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 34: 1049-1056.