



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DE FOTOBIORREATOR PARA  
TRATAMENTO DE EFLUENTE DOMÉSTICO PRÉ-TRATADO E CULTIVO  
DE *CHLORELLA SOROKINIANA*.

**Luiz Guilherme Buglione Peruch**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

**Bolsista CNPQ processo 138537/2021-6**

**São Carlos - SP  
2023**



LUIZ GUILHERME BUGLIONE PERUCH

AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DE FOTOBIORREATOR PARA TRATAMENTO DE EFLUENTE DOMÉSTICO PRÉ-TRATADO E CULTIVO DE *CHLORELLA SOROKINIANA*.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

***Orientador:***

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza  
Departamento Morfologia e Patologia - UFSCar

Prof. Dra. Katt Regina Lapa  
Departamento de Engenharia de Aquicultura - UFSC

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Socioeconomia Rural - UFSCar

São Carlos  
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Folha de aprovação**

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Mestrado do candidato Luiz Guilherme Buglione Peruch, realizada em 15/09/2023:

---

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Instituição - Universidade Federal de São Carlos

---

Prof. Dra. Katt Regina Lapa

Instituição - Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos

Instituição - Universidade Federal de São Carlos

***"A próxima grande era na história do nosso planeta é toda sobre restauração, e há tantos de nós que querem fazer parte disso. Temos uma grande oportunidade em nossas mãos e em nossos corações para mudar a direção em que estamos indo." - Dr. Sylvia Earle***



*Dedico este trabalho com imenso  
carinho e gratidão à minha querida  
Mãe, fonte inesgotável de inspiração  
acadêmica. E espero que meu pai não  
fique com ciúmes.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a minha meus pais Ademir e Glória e minha irmã Amabelle que mesmo de longe sempre se fizeram presentes, me apoiando de todas as formas possíveis nessa nova jornada longe de casa. Vocês são minha base e sou extremamente grato por tê-los no coração.

Agradecer também a todos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia – UFSCar, em especial ao professor Clovis que me aceitou para fazer parte deste projeto e sempre me orientou da melhor forma possível, também a Zélia que sempre esteve presente e me ajudou em todos os aspectos durante o período. Nessa lista não poderia faltar o Matheus (Danone) que me auxiliou logo que cheguei em São Carlos. Isa, Manu e Karen que participaram diretamente da execução dos experimentos.

Ainda gostaria de agradecer a parceria do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de águas – LATAR – da Universidade de São Paulo pela ajuda nos protocolos de análise de nutrientes e pela cessão do equipamento para análise de carbono. Ao Laboratório de Biotecnologia de Algas – LALGAS – da Universidade Federal de São Carlos pela parceria durante os dois anos e pela cessão também de equipamentos essenciais ao desenrolar do meu projeto de mestrado.

Devo muito a família do Rugby São Carlos, no qual encontrei apoio e grandes amizades fora do âmbito da universidade e que pretendo levar para vida toda.

Por fim ao Restaurante Universitário que me manteve alimentado durante todo esse tempo, servindo com grande qualidade todos os universitários – MUITO OBRIGADO <3 -.

Agradeço também à empresa C4 científica por acreditar em mim para realizar esse projeto, à toda disponibilidade da equipe para feedbacks e serviços realizados no fotobiorreator e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento - pelo apoio financeiro fornecido ao longo deste trabalho.



Buglione Peruch, Luiz Guilherme. **Avaliação e adaptação de fotobiorreator para tratamento de efluentes e cultivo de microalgas**, 2023. Dissertação. Programa de pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023.

## **RESUMO**

A escassez de água e poluição dos corpos hídricos é uma preocupação relevante na atualidade. A utilização de microalgas é uma tecnologia promissora para o refino dos processos de tratamento de esgoto doméstico e produção de compostos de interesse como lipídeos, carotenóides e pigmentos. Durante a fase do tratamento terciário de efluentes o uso de microalgas tem como objetivo, principalmente a remoção direta de nutrientes como fósforo e nitrogênio por meio da assimilação direta para produção de biomassa. Ainda existem diversos obstáculos que impedem a integralização do uso de microalgas em estações de tratamento de esgoto. O presente estudo teve como objetivo avaliar e aprimorar o fotobiorreator da empresa C4 Científica com foco em otimizar a remoção de nutrientes e a produção de biomassa. Foram realizadas bateladas de sete dias a dez dias, com diferentes esgotos e condições luminosas para mensurar a remoção de nitrogênio, fósforo e carbono totais, além da produção de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. Alcançou-se uma remoção de nitrogênio total de 85 % e fósforo total de 90 %, além concentração máxima de 325 mgL<sup>-1</sup> de biomassa seca após a modificação do fotobiorreator. Foi alcançada a remoção de 99 % das unidades formadoras de colônia de *E. coli*. O aprimoramento após a modificação do fotobiorreator gerou aumento de 36 % na concentração final de biomassa, diminuição da fase LOG e melhor padronização nas eficiências de remoção Fósforo total e Nitrogênio total. A adição de 5 % (V/V) de CO<sub>2</sub> não apresentou melhora nos parâmetros produtivos ou na remoção máxima de nutrientes. O Fotobiorreator demonstrou capacidade de remoção de nutrientes acentuada podendo ser utilizado para polimento do esgoto, tornando os efluentes elegíveis para descarte nos corpos hídricos após tratamento.

**Palavras-chave:** *Chlorella sorokiniana*; Saneamento; Remoção de nutrientes.

Buglione Peruch, Luiz Guilherme. **Avaliação e adaptação de fotobiorreator para tratamento de efluentes e cultivo de microalgas**, 2023. Dissertação. Programa de pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2023.

## **ABSTRACT**

Water scarcity and contamination of water bodies are relevant concerns in the present time. The utilization of microalgae represents a promising technology for enhancing domestic wastewater treatment processes and the production of compounds of interest such as lipids, carotenoids, and dyes. During the tertiary phase of effluent treatment, the use of microalgae primarily aims at the direct removal of nutrients such as phosphorus, nitrogen, and carbon through assimilation for biomass production. However, there are several obstacles that hinder the full integration of microalgae usage in wastewater treatment plants.

This present study aimed to assess and enhance the photobioreactor developed by C4 Científica, with a focus on optimizing nutrient removal and biomass production. Batch experiments were conducted over periods ranging from seven to ten days, using different sewage sources and light conditions to quantify the removal of total nitrogen, phosphorus, and carbon, as well as the biomass production of the microalga *Chlorella sorokiniana*. The modification of the photobioreactor led to a total nitrogen removal of 85% and a total phosphorus removal of 90%, along with a maximum biomass concentration of 325 mgL<sup>-1</sup> of dry biomass. Furthermore, a 99% removal of colony-forming units of *E. coli* was achieved.

The enhancement following the photobioreactor modification resulted in a 36% increase in biomass production, a reduction in the LOG phase, and improved consistency in the rates of total phosphorus and total nitrogen removal. The addition of 5% (V/V) CO<sub>2</sub> did not show improvement in productive parameters or nutrient removal efficiency. The Photobioreactor exhibited a pronounced nutrient removal capacity and can be employed for wastewater polishing, making the effluents suitable for disposal into water bodies after treatment.

**Keywords:** *Chlorella sorokiniana*; Sanitation; Nutrient Removal.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sistemas de cultivo de microalgas abertos e fechados. Adaptado e traduzido de Khor et al. (2022).....	23
<b>Figura 2.</b> Consórcio microalga X bactéria para tratamento de efluentes. Adaptado e traduzido de Ación Fernández et al., 2018 (SIROHI et al., 2022).....	26
<b>Figura 3.</b> Fotobiorreator C4 Científica para tratamento de efluentes e cultivo de microalgas. Foto do autor.....	30
<b>Figura 4.</b> Projeto 3D disposição inicial do Fotobiorreator. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.....	31
<b>Figura 5.</b> Corte A-A da Figura 4. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.....	31
<b>Figura 6.</b> Corte B-B da Figura 4. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.....	31
<b>Figura 7.</b> Biorreator de imersão temporária C4 Científica para vegetais superiores. Foto cedida pela empresa.....	32
<b>Figura 8.</b> Esquema – Vista superior - disposição de lâmpadas LED no interior do Fotobiorreator após mudanças recomendadas. Unidade de medida em metros. Esquema do autor. ....	33
<b>Figura 9.</b> Disposição das lâmpadas LED no interior do Fotobiorreator após mudanças recomendadas. Foto do autor.....	33
<b>Figura 10.</b> Foto e esquema da adaptação para bombeamento de CO <sub>2</sub> com identificação. Foto do autor.....	34
<b>Figura 11.</b> Locais de coleta dos efluentes. (1) Saída reator UASB Monjolinho, (2) Saída reator UASB Água Vermelha e (3) Lagoa anaeróbia e facultativa de Santa Eudóxia. Fotos do autor.....	36
<b>Figura 12.</b> Concentração celular no dia 7 do EXP1 nas diferentes posições dentro do fotobiorreator. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.....	45
<b>Figura 13.</b> Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP1 em %. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.....	46
<b>Figura 14.</b> Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP1 em %. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.....	46
<b>Figura 15.</b> Curva de concentração celular EXP2 por dia. Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.....	47

<b>Figura 16.</b> Biomassa seca no dia 7 do EXP2 em $\text{mgL}^{-1}$ . Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.....	48
<b>Figura 17.</b> (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP2 em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP2 em %. Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.....	48
<b>Figura 18.</b> Curva de concentração celular EXP3 em $\text{células mL}^{-1}$ . Esgoto proveniente Água Vermelha (AV), Esgoto proveniente Monjolinho (MJ) e Esgoto proveniente Santa Eudóxia (SE). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% confiança). N amostral/tratamento = 3. ....	50
<b>Figura 19.</b> Biomassa seca dia 7 EXP3 em $\text{mgL}^{-1}$ . Esgoto proveniente Água Vermelha (AV), Esgoto proveniente Monjolinho (MJ) e Esgoto proveniente Santa Eudóxia (SE). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3. ....	50
<b>Figura 20.</b> (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP3 em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP3 em %. Esgoto proveniente de Monjolinho (MJ), esgoto proveniente de Santa Eudóxia (SE) e esgoto proveniente de Água Vermelha (AV). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 3.....	51
<b>Figura 21.</b> Curva de concentração celular no EXP4 por dia. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	52
<b>Figura 22.</b> Biomassa seca dia 7 EXP4 em $\text{mgL}^{-1}$ . Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	53
<b>Figura 23.</b> (A) Boxplot índice de Velocidade específica de crescimento em $\text{d}^{-1}$ EXP4 ao final da fase LOG. (B) Boxplot tempo de duplicação em dia EXP4 ao final da fase LOG. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	53
<b>Figura 24.</b> Remoção de nitrogênio total no dia 7 EXP4. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	54

<b>Figura 25.</b> Remoção de fósforo total no dia 7 EXP4. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	55
<b>Figura 26.</b> Biomassa seca dia 7 tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4). Tratamento Monjolinho do Experimento 3 (MJ) e tratamento Colorida do Experimento 4 (Colorida). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 no EXP3 e 10 no EXP4. ....	56
<b>Figura 27.</b> Curva de concentração celular por dia tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4). Tratamento Monjolinho do Experimento 3 (MJ) e tratamento Colorida do Experimento 4 (Colorida). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 no EXP3 e 10 no EXP4. ....	57
<b>Figura 28.</b> (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 dos tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4) em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 dos tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4) em %. Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 para o tratamento MJ (EXP3) e 10 no tratamento Colorida (EXP4). ....	57
<b>Figura 29.</b> Curva de concentração celular por dia Experimento 5. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). N amostral/tratamento = 5. ....	58
<b>Figura 30.</b> Biomassa seca Experimento 5 no dia 5 em mgL <sup>-1</sup> . Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5. ....	59
<b>Figura 31.</b> Biomassa seca Experimento 5 no dia 10 em mgL <sup>-1</sup> . Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5. ....	59
<b>Figura 32.</b> (A) Taxa de Velocidade específica de crescimento experimento 5 em d <sup>-1</sup> ao final da fase LOG. (B) Tempo de duplicação experimento 5 em Dias ao final da fase LOG. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5. ....	60
<b>Figura 33.</b> Remoção de Fósforo total em % experimento 5 no dia 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5. ....	61

<b>Figura 34.</b> Remoção de nitrogênio total em % no experimento 5 no dia 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5. ....	61
<b>Figura 35.</b> (A) Remoção de Carbono inorgânico durante o experimento em % relativa ao dia 0 (100%). (B) Remoção de Carbono orgânico durante o experimento em % relativa ao dia 0 (100%). Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). N amostral/tratamento = 5.....	62
<b>Figura 36.</b> Diminuição na contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias E. coli em % no dia 10 do experimento 5. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Caracterização dos esgotos sanitários utilizados nos experimentos. ....	36
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio de cultura BG11. ....	37
<b>Tabela 3.</b> Composição traços de solução de metal* <sup>1</sup> .....	37
<b>Tabela 4.</b> Detalhamento da intensidade luminosa na fase clara dos experimentos. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Ensaios laboratoriais EXP1 A EXP4. ....	40
<b>Tabela 6.</b> Ensaios laboratoriais EXP5.....	40
<b>Tabela 7.</b> Concentração de metais pesados nas amostras de efluentes do Monjolinho, Santa Eudóxia e Água Vermelha. Quantidades em mgL <sup>-1</sup> . ....	49
<b>Tabela 8.</b> Compilação de índice de velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação do EXP4 ao final da fase LOG. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10. ....	54
<b>Tabela 9.</b> Compilação Parâmetros produtivos entre os tratamentos MJ (EXP3) x Colorido (EXP4). Concentração celular final, biomassa seca, remoção de nitrogênio total, remoção de fósforo total, velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação. Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 3 para tratamento Monjolinho e 10 para tratamento colorido. ....	55
<b>Tabela 10.</b> Compilação da remoção de carbono total e carbono inorgânico em % e valores totais em mgL <sup>-1</sup> nos dias 0, 5, 6, 7 e 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO <sub>2</sub> (5% V/V). N amostral/tratamento = 5 .....	62

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>20</b>
<b>1.1 Esgoto sanitário</b>	<b>20</b>
<b>1.2 Microalgas</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Fotobiorreatores (PBR)</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Tratamento de esgoto com microalgas</b>	<b>25</b>
<b>1.5 Problemáticas e tendências futuras</b>	<b>26</b>
<b>2. Justificativa</b>	<b>28</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>29</b>
<b>4. Material e métodos</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Fotobiorreator</b>	<b>30</b>
4.1.2 Fotobiorreator modificado	32
4.1.3 Fotobiorreator com adição de carbono inorgânico	33
<b>4.2 Efluente</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Microalga</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Condições ambientais</b>	<b>38</b>
4.4.1 Condições gerais	38
4.4.2 Condições específicas	38
<b>4.5 Coletas experimentais e métodos analíticos</b>	<b>39</b>
4.5.1 Contagem de células	40
4.5.2 Absorbância total	41
4.5.3 Espectrofotometria de Fluorescência azul	41
4.5.4 Peso seco	41
4.5.5 Verificação pH	41
4.5.6 Quantificação de Fósforo Total	42
4.5.7 Quantificação de Nitrogênio Total	42

4.5.8	Quantificação de Carbono .....	42
4.5.9	Índices produtivos .....	42
4.5.10	Metais pesados.....	43
4.5.11	Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	43
<b>4.6</b>	<b>Estatísticas .....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b><i>Resultados</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Considerações preliminares.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Fase Exploratória .....</b>	<b>44</b>
5.2.1	Experimento 1 .....	44
5.2.2	Experimento 2 .....	47
5.2.3	Experimento 3 .....	49
<b>5.3</b>	<b>Fase Analítica.....</b>	<b>51</b>
5.3.1	Considerações iniciais.....	51
5.3.2	Experimento 4 .....	52
5.3.3	Índices produtivos e de remoção pré x pós alterações no Fotobiorreator.....	55
5.3.4	Experimento 5 .....	57
<b>6.</b>	<b><i>Discussão</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b>Parâmetros ambientais .....</b>	<b>64</b>
<b>6.2</b>	<b>Parâmetros produtivos.....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b><i>Conclusões</i>.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b><i>Perspectivas para o futuro</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b><i>Referencias</i> .....</b>	<b>71</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Esgoto sanitário

A crescente escassez global de água, combinada com o rápido crescimento populacional na última década, gera preocupação sobre práticas apropriadas para manejo de recursos hídricos, como é reconhecido por organizações importantes como Banco Mundial. O modelo atual de manejo de efluentes urbanos é baseado no descarte do efluente tratado, mas deve ser transformado em processo sustentável baseado na recuperação de água e dos nutrientes ali presentes (JANHESI; MISHRA, 2013).

O mundo irá enfrentar um déficit hídrico de 40 % até 2030, o que é um grande desafio para o desenvolvimento socioeconômico (SUN *et al.*, 2016). Esse déficit deve ser proveniente da crescente demanda hídrica, contaminação das fontes de água e falta de tecnologia para recuperar os recursos hídricos (KUMAR; PAL, 2015). Nutrientes como o nitrogênio e fósforo estão naturalmente presentes no ambiente aquático, seja pelo escoamento superficial ou proveniente do solo e águas subterrâneas. Entretanto, atividades antropogênicas intensificam a carga de nutrientes presentes nos corpos d'água, como o esgoto sanitário não tratado e fertilizantes agrícolas (RUHLAND; PATERSON; SMOL, 2008). Grandes quantidades de esgoto contendo níveis excessivos de nutrientes são gerados por atividades urbanas, industriais e agrícolas, resultando na eutrofização dos ambientes aquáticos (SUKACOVA; TRTILEK; RATAJ, 2015).

A eutrofização é um processo natural, porém quando causado em grande intensidade por razões humanas, gera uma série de alterações no ecossistema, como boom de algas, cianobactérias e macrófitas aquáticas devido a alteração nas concentrações dos nutrientes. Ocorrendo diminuição das taxas de oxigênio dissolvido no período escuro, devido a respiração celular, causando diminuição da diversidade ecológica. (KWON; OH; YANG, 2013)

A eutrofização pode afetar também o consumo humano da água proveniente do local pela presença de gosto e/ou odor desagradável, aumento da turbidez e liberação de gases como metano e amônia devido a decomposição da matéria orgânica no fundo do corpo hídrico (KWON; OH; YANG, 2013).

Segundo a Associação Brasileira de Normas e Técnicas – ABNT – (1986), norma técnica brasileira NR 9648, esgoto pode ser definido como: “despejo líquido constituído de esgotos doméstico e industrial, água de infiltração e a contribuição pluvial parasitária”

## 1.2 Microalgas

Microalgas são organismos fotossintéticos predominantemente aquáticos com simples estrutura – sem raízes, folhas ou hastes. Não formam um único grupo monofilético e por isso não podem ser facilmente definidas. A estrutura interna das algas varia de grupo para grupo, porém não apresenta estrutura multicelular como as macrófitas aquáticas. Algas Eucarióticas são compostas de núcleo e cloroplastos, além de mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático e outras organelas (KWON; OH; YANG, 2013).

As microalgas contribuem com cerca de 50 % da produção fotossintética do planeta Terra, acontecendo majoritariamente nos oceanos (FALKOWSKI; KNOLL, 2007). Fotossíntese é o processo de conversão na qual seres fotoautotróficos convertem compostos inorgânicos e energia luminosa em matéria orgânica. Essa reação é dividida em duas fases, fase clara e fase escura. Na fase clara, a energia luminosa é transformada em energia química nas membranas da célula, produzindo NADPH<sub>2</sub> e ATP. Na fase escura esses compostos são utilizados na redução bioquímica do CO<sub>2</sub> em carboidratos no estroma (MASOJDDEK; TORZILLO; KOBLDZEK, 2013).

A microalga escolhida para utilização no trabalho foi a espécie *Chlorella sorokiniana*. O nome *Chlorella* refere a qualquer alga do gênero *Chlorella*, são células esféricas ou elipsoidais com tamanho variando entre 2 e 10 micrômetros de diâmetro. Estão presentes em diversos ambientes como água doce, salgada, solo ou em associações com líquens e protozoários. A reprodução do gênero *Chlorella* é por reprodução assexuada por processo de produção de esporos. O processo envolve três fases, crescimento, maturação e divisão, no qual a célula cresce de tamanho, produz substâncias para a mitose e se divide. Cada ruptura produz de dois a dezesseis novas células (MORIMURA, 1959).

O gênero em questão tem potencial para ser utilizado para diversos fins. O uso como substituto nutricional para humanos e animais é o mais utilizado devido à grande quantidade de proteína presente na célula – cerca de 70 % do peso seco. Além disso, a espécie é rica em vitaminas, minerais e carotenóides. Em ambiente de estresse, como alta luminosidade e restrição de nitrogênio, pode sintetizar grande quantidade de lipídios – cerca de 50 % do peso seco – principalmente o Triacilglicerol (TAG). Estes fatores tornam a microalga do gênero *Chlorella* uma ótima candidata à base de biocombustíveis. (LIU; HU, 2013)

A utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis utilizando esgoto como meio de cultura e gases provenientes de indústrias a base de queima de combustível fóssil

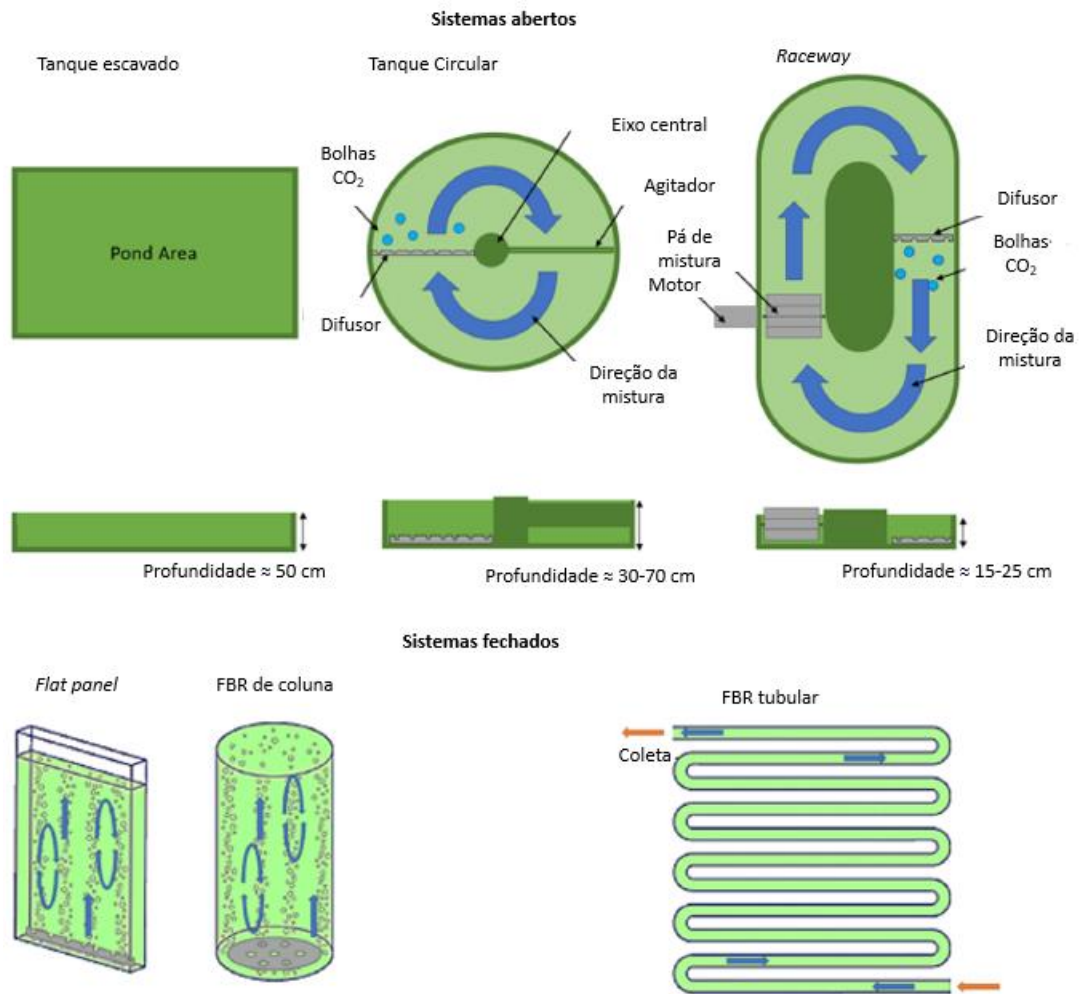
como suplemento de carbono inorgânico tem um grande potencial no tratamento desses efluentes hídricos e gasosos, além da diminuição do custo de produção desses biocompostos. Ainda, a microalga pode produzir compostos químicos de alto valor agregado como carotenóides e proteínas sob condições específicas (LIU; HU, 2013).

### 1.3 Fotobiorreatores (PBR)

A cultura de microalgas não é um processo simples, mas sim uma complexa relação entre diversos fatores bióticos, abióticos, parâmetros de operação e respostas biológicas de todo o sistema. Influência de diversos fatores, como temperatura, pH, nível de nutrientes, engenharia do fotobiorreator, entre outros, faz com que o cultivo de microalgas em fotobiorreatores seja uma tecnologia complexa e que demanda uma gama de conhecimento interdisciplinar completo (NEVES, 2013).

Devido à grande complexidade de fatores e tecnologia necessária, o desenvolvimento de fotobiorreatores para cultivo de microalgas é um tema muito estudado na atualidade. Apesar disso, o cultivo em grande escala nos dias de hoje é em grande parte de culturas extremófilas em tanques abertos, com baixa produtividade e pouco ou nenhum controle dos fatores ambientais. Porém devido às vantagens e possibilidades do cultivo de microalgas, como a produção de diversos compostos de interesse, principalmente para produção de biodiesel, as pesquisas com foco no estado da arte dos fotobiorreatores tem grande investimento em todo o mundo, buscando altas produtividades, baixa contaminação e principalmente viabilidade econômica (LEGRAND; ARTU; PRUVOST, 2021).

O cultivo de microalgas pode ser dividido em dois grandes modelos, o cultivo em sistemas abertos ou fechados. Representados na figura 1.



**Figura 1.** Sistemas de cultivo de microalgas abertos e fechados. Adaptado e traduzido de Khor *et al.* (2022).

Os sistemas abertos mais simples são utilizados há mais de 2.000 anos por populações antigas e geralmente consistem em tanques escavados, com tamanhos até 250 ha. Nesses cultivos aplica-se baixo uso de tecnologia e apresenta grande dependência dos fatores ambientais externos, como temperatura, precipitação, quantidade e qualidade de luz solar entre outros (LEGRAND; ARTU; PRUVOST, 2021). Os tanques abertos apresentam dificuldades como baixa difusão de nutrientes e alta contaminação (FAO, 2009).

Ainda dentro dos sistemas abertos, encontram-se os sistemas tipo *Raceway* e sistemas circulares. Apesar de serem cultivos já com uso de tecnologia, ainda são sistemas muito simples, porém contêm algum método de agitação, com uso de pás rotativas por exemplo. São construídos em concreto ou em tanques escavados revestidos com geomembrana. Apresentam melhor produtividade devido à agitação do sistema e ainda baixo custo quando comparados com sistemas de produção fechados (NEVES, 2013).

Quando se trata de sistemas fechados de cultivo de microalgas, pode-se encontrar uma vasta gama de tecnologias e métodos. Os fotobiorreatores podem ter diversas fontes de luz, design, configurações, suplementações e meios de cultura. Devem buscar minimizar o efeito da sedimentação e incrustação “*Fouling*” das microalgas dentro do sistema, maximizar a relação de área iluminada/área “escura” e operar sob complexas condições (ZHOU *et al.*, 2020).

Os fotobiorreatores fechados podem ser classificados quanto ao tipo do misturador, posição dos tubos, tipo da estrutura, entre outros. Os principais tipos de fotobiorreatores fechados são os Tubulares verticais ou horizontais, *flat panel* (Painel plano) e de coluna.

Os fotobiorreatores tubulares são compostos por tubos de material translúcido como vidro ou plástico, dividido em uma parte de tubulação onde o crescimento fotossintético acontece e uma área de mistura, onde a cultura recebe tratamento, remoção de oxigênio e é bombeada pelo sistema com bombas hidráulicas. Sistema muito utilizado com iluminação natural em áreas externas buscando diminuir o custo de produção. Os tubos podem ser posicionados de maneira vertical ou de maneira horizontal (SIROHI *et al.*, 2022).

Fotobiorreatores do tipo *flat panel* são compostos de uma ou mais superfícies planas, feita de material transparente, podendo estar na posição vertical ou horizontal. Apresentam alta relação superfície/volume, o que faz com que esse modelo de fotobiorreator apresente alto aproveitamento da iluminação, seja natural ou artificial. Um dos grandes gargalos desse tipo de fotobiorreator é a mistura da solução, principalmente nos modelos verticais que apresentam grande coluna de água (SIROHI *et al.*, 2022).

Por fim, os fotobiorreatores de coluna são compostos por cilindros verticais feitos de material translúcido, muito utilizados materiais plásticos não rígidos, como “sacos”, misturados por ar atmosférico ou com suplementação de CO<sub>2</sub>, por meio de dispositivos na parte inferior das colunas. Apresentam uma ótima otimização da transferência de massa dos gases para a cultura, baixa utilização de energia e grande controle dos fatores físico-químicos (KHOR *et al.*, 2022).

O uso de sistemas híbridos também é possível, misturando aspectos menos custosos com tecnologia de forma que o melhor de cada sistema seja aproveitado, como por exemplo, o uso de *raceways* com sistemas tubulares fechados para melhor aproveitamento de espaço e maior produção de biomassa, alcançando maior produtividade com um menor custo financeiro (SIROHI *et al.*, 2022).

Quando comparados os sistemas fechados e abertos, nota-se que os sistemas abertos apresentam menor custo de implementação e operação, porém não possibilitam controle dos parâmetros ambientais, recebem grande quantidade de contaminação e apresentam menor produtividade. Já os sistemas fechados necessitam de um maior investimento financeiro para implementação, complexa operação e maior custo de produção, porém apresentam grande produtividade, alto controle dos fatores ambientais – possibilitando a produção de compostos de interesse específicos – baixa contaminação além da possibilidade de utilização de áreas não próprias para produção de alimento ou compostos comuns, como nos desertos (NEVES, 2013) (ZHOU *et al.*, 2020) (KHOR *et al.*, 2022) (CHERNICHARO; VON SPERLING, 2005).

#### 1.4 Tratamento de esgoto com microalgas

Atualmente o tratamento de esgoto realizado nas estações de tratamento de esgoto (ETE) é composto por duas ou três fases, sendo elas o tratamento preliminar (1), tratamento primário (2) e tratamento secundário (3), podendo em poucos casos realizar o tratamento terciário ou polimento do esgoto (4). Cada fase tem um objetivo (DAS *et al.*, 2019):

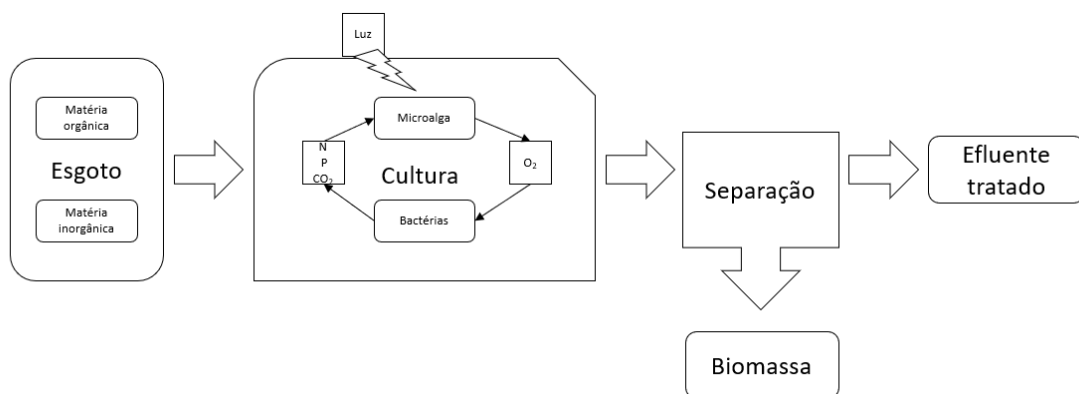
1. Remover de sólidos grosseiros por meio de processos físicos como gradeamento e/ou com caixas de areia;
2. Remover de sólidos sedimentáveis;
3. Remover matéria orgânica por meio de processos biológicos, com remoção parcial de nutrientes;
4. Remover compostos específicos de acordo com a necessidade da ETE, como nutrientes, metais pesados, fármacos ou outros poluentes, podendo ser empregados métodos físicos, químicos ou biológicos de acordo com as necessidades da ETE.

A resolução brasileira que dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes é a resolução 430 de 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA -, que complementa e altera a resolução número 357 de 17 de março de 2005. Para os parâmetros avaliados neste trabalho, a disposição estabelece uma concentração máxima de despejo de 20 mgL<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal total e para fósforo o órgão ambiental responsável poderá definir padrões específicos para corpos receptores com registros históricos de floração de cianobactérias.

O tratamento de esgoto com microalgas se encaixa no tratamento terciário ou polimento do esgoto, podendo ter diferentes objetivos como a remoção de nutrientes como fósforo e nitrogênio, até a remoção de metais pesados ou fármacos por diferentes vias metabólicas das microalgas (KWON; OH; YANG, 2013) (KWON; OH; YANG, 2013) (MASOJDDEK; TORZILLO; KOBOLDZEK, 2013).

O uso de microalgas em processos de biorremediação de esgoto pode retirar nutrientes como fósforo e nitrogênio do esgoto e manter o nível de oxigênio dissolvido alto, auxiliando na redução de patógenos e bactérias fecais (CHAI *et al.*, 2021). Podendo utilizar de diferentes vias metabólicas, as microalgas realizam a remoção de metais pesados, fármacos, coloração e pesticidas de maneira efetiva (QUIJANO; ARCILA; BUITRÓN, 2017).

A utilização de microalgas para o tratamento de esgoto tem dois principais objetivos, a remoção direta de contaminantes e nutrientes e o benefício do consórcio entre microalgas e bactérias (Figura 2). O consórcio de culturas de microalgas e bactérias é benéfico para ambos os microrganismos, as microalgas fornecem O<sub>2</sub> proveniente da fotossíntese para a assimilação de matéria orgânica pelas bactérias, que por sua vez liberam CO<sub>2</sub> neste processo, que é utilizado pelas microalgas em seu ciclo, após os processos a biomassa é removida, resultando em efluente tratado e biomassa para uso comercial. Esse consórcio diminui diretamente os custos de tratamento de esgoto (FERNANDEZ; GÓMEZ-SERRANO; FERNÁNDEZ-SEVILLA, 2018).



**Figura 2.** Consórcio microalga X bactéria para tratamento de efluentes. Adaptado e traduzido de Acien Fernández *et al.*, 2018 (SIROHI *et al.*, 2022).

### 1.5 Problemáticas e tendências futuras

A utilização de microalgas é uma técnica consolidada no tratamento de esgoto e tem papel importante no fortalecimento da economia circular, produzindo biomassa e compostos de interesse, como lipídeos, proteínas e corantes de alta qualidade. Dessa forma, diminuindo

o custo de tratamento de esgoto e melhorando a qualidade do mesmo (WOLLMANN *et al.*, 2019). Porém ainda são encontradas barreiras financeiras e metodológicas para a ampliação do processo e utilização em larga escala. Os principais objetivos dos estudos relacionados ao tratamento de esgoto com microalgas têm como foco a padronização dos processos, confiabilidade e eficiência do tratamento e diminuição do custo de operação do mesmo (MOHSENPOUR *et al.*, 2021) (CALLEGARI *et al.*, 2020).

A combinação de processos de cultivo de microalgas juntamente com o tratamento de esgoto pode diminuir o custo da produção de biocombustíveis de terceira geração. Por exemplo o cultivo de microalgas com tratamento de esgoto, apresenta a maior taxa de fixação de carbono atmosférico – 1,83 kg de CO<sub>2</sub> para 1 kg de biomassa –, a maior produtividade entre os processos de biorestauração e a maior degradação de contaminantes quando comparado com plantações no solo. (LI;LI;HO, 2022)

De forma prática, a operação de ETE com utilização de microalgas é dificultada pois diferentes fontes de esgoto podem conter fatores que inibem o crescimento de microalgas, como zooplânctons predadores, concentrações proibitivas de nutrientes e/ou metais pesados não tolerados pelas microalgas (OSUNDEKO *et al.*, 2014).

Encontrar soluções sustentáveis e financeiramente viáveis para o tratamento de esgoto são necessárias e complicadas ao mesmo tempo. A implementação de forma geral desse processo ainda é economicamente e ambientalmente desfavorável. Os principais fatores que tornam o processo inviável são custo de separação de biomassa, estudos ainda em pequena escala, baixa produção de metabólitos de interesse e contaminação da biomassa por metais pesados (CHIA *et al.*, 2018).

Para que se torne economicamente viável o processo de tratamento de esgoto com microalgas, técnicas de produção de múltiplos benefícios devem ser utilizadas, os chamados co-processos ou co-produtos, que são essenciais para o aumento da produtividade dos processos. Como a produção de biocompostos através da biomassa da microalga produzida no processo (DERNER *et al.*, 2006). Além disso um co-processo muito importante nas estações de tratamento é a cooperação entre microalgas e bactérias aeróbicas, exemplificada na figura 2, no qual as microalgas fornecem oxigênio para as bactérias pela fotossíntese que pode usar luz natural como fonte de energia, diminuindo nesses casos, o custo do uso de sopradores de ar ou injeção de oxigênio puro nos sistemas. (SIROHI *et al.*, 2022)

## 2. Justificativa

O processo de tratamento de esgoto com microalgas demonstra grande potencial no combate a escassez de água e poluição dos corpos hídricos enquanto fortalece a economia circular produzindo metabólitos de interesse e recuperando nutrientes. Estudos ainda são necessários para que o processo se torne viável e acessível a todos. A produção de fotobiorreatores de pequena escala para tratamento *in-loco* do efluente pode ser uma alternativa. Este trabalho foi realizado com o intuito de avaliar o fotobiorreator de imersão temporária e adaptá-lo para o tratamento de efluentes e produção de microalgas em regime de imersão total, por meio de mudanças nas configurações luminosas e padrões de cultivo do mesmo.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

O Objetivo geral dessa dissertação de mestrado foi avaliar e otimizar o desempenho do fotobiorreator de imersão temporária visando a remoção de nutrientes do esgoto sanitário pré tratado, o aumento da produção de microalgas e a redução de bactérias patogênicas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições luminosas do biorreator mediante da medição com aparelhos;
- Avaliar remoção de nutrientes na configuração inicial do aparelho;
- Avaliar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* no biorreator nas condições iniciais de iluminação e aeração;
- Propor mudanças nas características técnicas do equipamento, visando a melhoria do mesmo após a análise dos dados gerados nos experimentos iniciais;
- Avaliar o resultado das mudanças luminosas no equipamento mediante medições e análises quantitativas das bateladas realizadas, no que diz a produção de microalgas, remoção de nutrientes e diminuição de coliformes totais;
- Avaliar a influência da adição de carbono inorgânico na forma de CO<sub>2</sub> no crescimento da microalga e/ou na remoção de nutrientes.

## 4 Material e métodos

As técnicas analíticas foram de determinação de remoção total de nutrientes, uma vez que o interesse maior é a remoção e reciclagem dos mesmos.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia – LMP – do Departamento de Morfologia e Patologia – DMP – da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar – localizada em São Carlos, SP.

### 4.1 Fotobiorreator

O fotobiorreator foi utilizado em diversas bateladas, e em 3 configurações diferentes. A primeira foi a configuração em que o fotobiorreator foi recebido, a segunda configuração luminosa foi recomendada após algumas bateladas de operação e a última foi utilizada apenas no Experimento 5, no qual houve adição de carbono inorgânico na forma de CO<sub>2</sub> no sistema.

O Fotobiorreator foi mantido em sala fechada com controle luminoso e térmico de 24 °C ± 2, para mitigar a influência dos fatores externos.

#### 4.1.1 Fotobiorreator inicial

O Fotobiorreator (Figura 3) foi cedido pela empresa C4 Científica. Seu projeto inicial foi concebido como um Biorreator de Imersão temporária para crescimento de mudas de vegetais superiores, com imersão temporária de meio de cultura (Figura 4, 5, 6 e 7).



**Figura 3.** Fotobiorreator C4 Científica para tratamento de efluentes e cultivo de microalgas. Foto do autor.

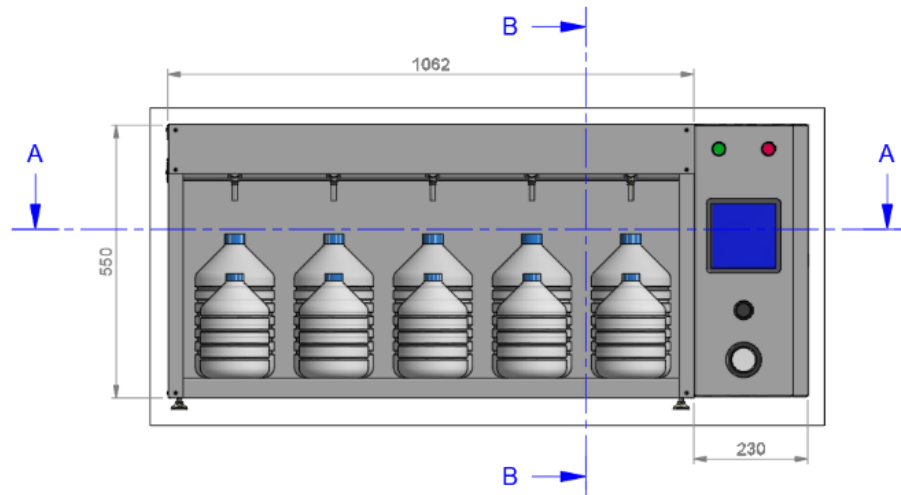


Figura 4. Projeto 3D disposição inicial do Fotobiorreator. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.

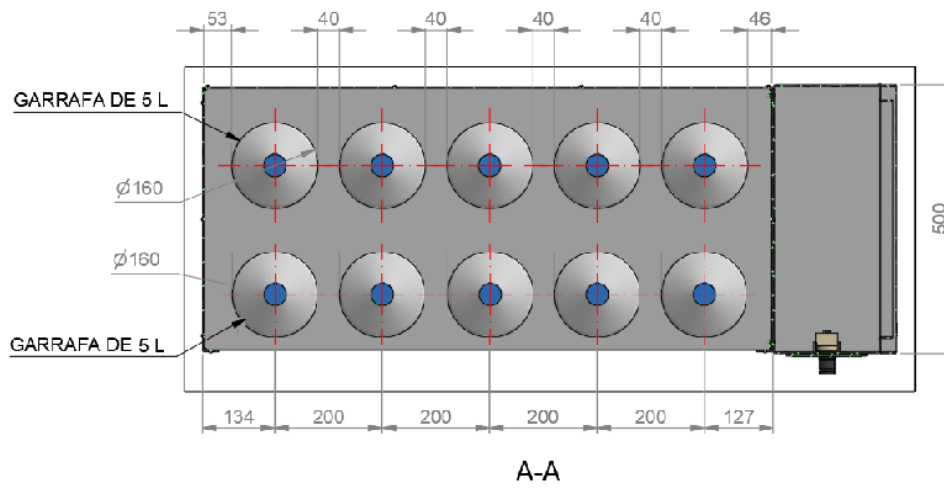


Figura 5. Corte A-A da Figura 4. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.

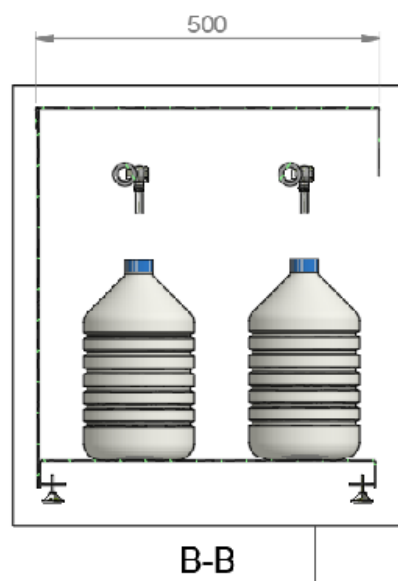


Figura 6. Corte B-B da Figura 4. Fonte: C4 Científica. Medidas em mm.



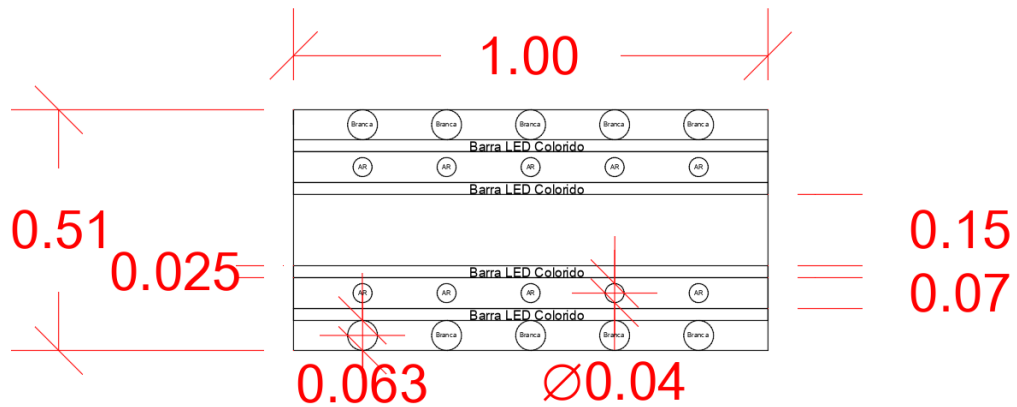
**Figura 7.** Biorreator de imersão temporária C4 Científica para vegetais superiores. Foto cedida pela empresa.

Para o experimento 1 a 3 a máquina contou com 10 módulos de cultivo, com galões transparentes de Polietileno tereftalato (PET) de 15,5 cm de diâmetro e 29,7 cm de altura, com 5 L de capacidade total sendo 3 L úteis. Contou com uma faixa de LED centralizada na parte superior do aparelho e 5 focos de LED branco na parte anterior do equipamento, apontados para a parte posterior do equipamento. Contou com compressor de ar com  $32 \text{ Lmin}^{-1}$  de vazão. E temporizador programável para luz. Devido à disposição das lâmpadas no equipamento, a iluminação era pouco homogênea, criando três diferentes regiões luminosas. Frente e Fundo com menor incidência luminosa e uma área central (Meio) com maior iluminação, descritas na tabela 3 na sessão de 4.4.2 condições específicas.

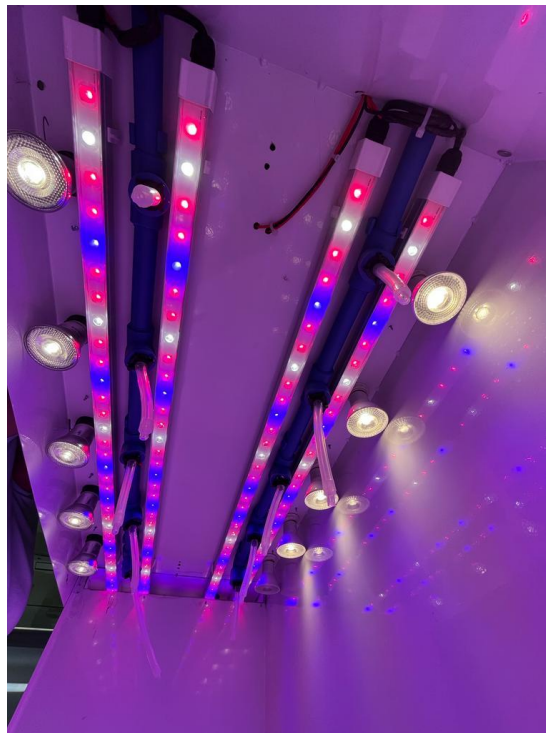
#### 4.1.2 Fotobiorreator modificado

Após os 3 primeiros experimentos foram delineadas mudanças na configuração luminosa do fotobiorreator, buscando melhor padronização do mesmo e maior produtividade/remoção de nutrientes.

Após a alteração realizada para os experimentos 4 e 5, o fotobiorreator contou com 4 faixas de led colorido (36 W com espectro 660nm + 440nm + branco), 2 frontais e 2 traseiras em conjunto com 10 spots de led branco (Espectro de luz completo). Além disso, foi possível utilizar as luzes de forma alternada, visto que os disjuntores das luzes foram separados. Como demonstrado nas figuras 8 e 9.



**Figura 8.** Esquema – Vista superior - disposição de lâmpadas LED no interior do Fotobiorreator após mudanças recomendadas. Unidade de medida em metros. Esquema do autor.

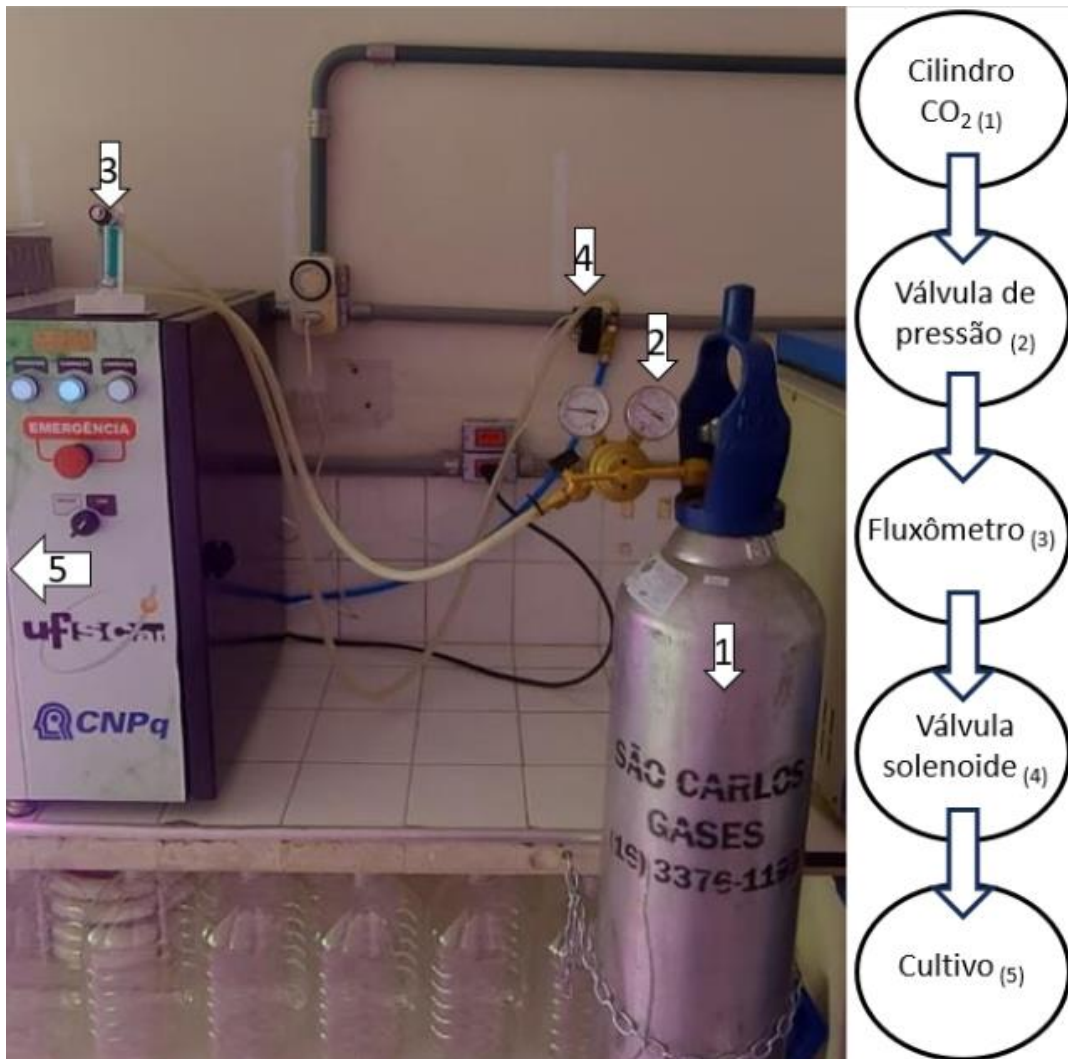


**Figura 9.** Disposição das lâmpadas LED no interior do Fotobiorreator após mudanças recomendadas. Foto do autor.

#### 4.1.3 Fotobiorreator com adição de carbono inorgânico

Para o experimento 5 a disposição luminosa não mudou, porém foi adicionada injeção de carbono inorgânico no fotobiorreator, por meio de do borbulhamento de  $\text{CO}_2$  juntamente com a aeração, apenas na fileira traseira. Para isso foi instalado um cilindro de 20 kg de  $\text{CO}_2$  puro na parte externa do fotobiorreator e por intermédio de fluxômetro foi controlada a adição de  $\text{CO}_2$  com taxa de 5 % (V/V) de bombeamento da aeração –  $0,8 \text{ Lm}^{-1}$  -. O bombeamento de  $\text{CO}_2$  foi realizado apenas no período “Claro” do sistema, ou seja, 12 horas por dia.

Na saída do cilindro de CO<sub>2</sub> foi instalada uma válvula de pressão, um fluxômetro foi utilizado para controlar a vazão, após o fluxômetro uma válvula solenóide com temporizador. Saindo da válvula solenóide o sistema é alimentado na fileira traseira, juntamente com a aeração. Como representado no esquema da figura 10.



**Figura 10.** Foto e esquema da adaptação para bombeamento de CO<sub>2</sub> com identificação. Foto do autor.

#### 4.2 Efluente

Para os experimentos foram testadas diferentes fontes de efluentes tratados, visto que diferentes ETE e localidades podem apresentar diferentes características físico-químicas do efluente, que podem viabilizar ou não o cultivo de microalgas, dessa forma foram utilizadas 4 fontes diferentes.

1. ETE de Candeia da cidade de Bauru – SP;
2. ETE Monjolinho da cidade de São Carlos – SP;
3. ETE de Água Vermelha da região de Água Vermelha na cidade de São Carlos, SP;

4. ETE de Santa Eudóxia da região de Santa Eudóxia na cidade de São Carlos, SP;

O efluente proveniente da ETE de Bauru – Identificado com BA – foi utilizado nos experimentos iniciais, 1 e 2. Já os efluentes Monjolinho (MJ), Água Vermelha (AV) e Santa Eudóxia (SE) foram utilizados no experimento 3 e comparados, foi-se então decidido pelo uso do efluente MJ para os experimentos 4 e 5 devido a maior concentração final de biomassa seca, remoção de nutrientes e concentração celular máxima.

Os efluentes foram coletados e armazenados em galões opacos de 20 L e mantidos congelados em freezer horizontal a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para serem utilizados, foram descongelados à temperatura ambiente e aerados por 6 horas para extravasar a espuma proveniente da proliferação de microrganismos filamentosos dormentes no sistema, juntamente com a matéria orgânica, que devido a aeração formam uma rede que gera espuma, evitando assim que o extravasamento aconteça já dentro do fotobiorreator.

O efluente BA foi coletado na ETE Candeia na cidade de Bauru – SP, a ETE atende cerca de 50.000 habitantes e o efluente passa por pré-tratamento, tratamento primário e secundário (Gradeamento + caixa de areia e UASB respectivamente) sendo coletado para os experimentos no extravasor tratamento secundário.

O efluente MJ foi coletado na ETE Monjolinho, localizada na cidade de São Carlos – SP, a ETE trata parte do esgoto gerado na cidade de São Carlos, tratando cerca de  $457 \text{ L s}^{-1}$ . O efluente foi coletado após tratamento secundário, na saída do reator UASB (Figura 11-1).

O efluente AV foi coletado na ETE de Água Vermelha, distrito da cidade de São Carlos – SP, a ETE de pequeno volume conta com tratamento preliminar, primário e desinfecção do efluente e descarte no Rio Araras. O efluente foi coletado na saída do reator UASB (Figura 11-2).

O efluente SE foi coletado na ETE de Santa Eudóxia, também distrito da cidade de São Carlos – SP, e atende cerca de 4.800 habitantes da zona urbana, a ETE conta com tratamento preliminar, lagoa de anaeróbia e lagoa facultativa. O efluente foi coletado na saída da lagoa anaeróbia (Figura 11-3).



**Figura 11.** Locais de coleta dos efluentes. (1) Saída reator UASB Monjolinho, (2) Saída reator UASB Água Vermelha e (3) Lagoa anaeróbia e facultativa de Santa Eudóxia. Fotos do autor.

A tabela 1, abaixo, traz um comparativo das ETE e uma breve caracterização do esgoto sanitário proveniente das mesmas.

**Tabela 1.** Caracterização dos esgotos sanitários utilizados nos experimentos.

	ETE Bauru	ETE MJ	ETE AV	ETE SE
Localização	Bauru - SP	São Carlos - SP	São Carlos - SP	São Carlos - SP
Processos	Tratamento preliminar, primário e secundário	Tratamento preliminar, primário, secundário e desinfecção	Tratamento preliminar, primário, secundário e desinfecção	Tratamento preliminar, lagoa anaeróbia e lagoa facultativa
Local de coleta	Saída UASB	Saída UASB	Saída UASB	Saída lagoa anaeróbia
Habitantes	50.000	258.451 (2015)	5.000	4.800
Vazão média	60 a 100 Ls <sup>-1</sup>	457 Ls <sup>-1</sup>	8 Ls <sup>-1</sup>	15 Ls <sup>-1</sup>
Nitrogênio total	15,56 mgL <sup>-1</sup>	15,83 mgL <sup>-1</sup>	33,38 mgL <sup>-1</sup>	26,04 mgL <sup>-1</sup>
Fósforo total	4,88 mgL <sup>-1</sup>	2,03 mgL <sup>-1</sup>	7,53 mgL <sup>-1</sup>	5,74 mgL <sup>-1</sup>
Carbono total	-	86,28 mgL <sup>-1</sup>	-	-

### 4.3 Microalga

A obtenção da microalga escolhida *Chlorella sorokiniana*, identificada pelo fornecedor como UTEX1230, foi por meio da coleção de culturas de algas da *University of Texas* (UTEX) em Austin, no Estados Unidos da América. A cepa isolada foi adquirida pela Universidade Federal de São Carlos (USFCar) e mantida no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia – UFSCar – em meio de cultura BG11 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Composição do meio de cultura BG11.

Componentes	Concentração (mgL <sup>-1</sup> )
NaNO <sub>3</sub>	1500
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	40
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	72
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20
CaCl <sub>2</sub>	27
Ácido Cítrico Monoidratado	6
Citrato Férrico de amônio	6
Na <sub>2</sub> EDTA	1
Traços de solução de metal* <sup>1</sup>	1

Fonte: (RIPPKA, R. 1979)

**Tabela 3.** Composição traços de solução de metal\*<sup>1</sup>

Componentes	Concentração (mgL <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2860
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1810
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	222
NaMoO <sub>4</sub>	390
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	79
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494

#### 4.4 Condições ambientais

##### 4.4.1 Condições gerais

Os experimentos foram realizados em sistema de batelada única com duração de 7 a 10 dias, abrangendo todas as fases de crescimento das microalgas, da fase LAG à fase de mortalidade. Para inóculo, as microalgas foram aclimatadas em esgoto autoclavado com 2 repiques de 7 dias cada, para adaptação aos fatores abióticos do efluente e as condições de alta luminosidade. Dessa forma as microalgas têm plenas condições de competir com os outros fatores bióticos do efluente - Fungos, outras microalgas, bactérias entre outros - de forma igualitária pelos nutrientes. Após a aclimação, as microalgas foram inoculadas nos frascos dos experimentos em concentração inicial de  $3 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  células $\mu\text{L}^{-1}$  em cada unidade com efluente real não autoclavado.

O fotoperíodo foi de 12:12 (claro: escuro) controlado de forma automatizada com uso de timer eletrônico.

A luminosidade e temperatura foram medidas a cada 5 minutos em LUX com o equipamento HOBO "*pendant temperature/light 64k data logger*" e uma vez por experimento, visto que a variação diária era baixa, em PAR – *photosynthetically active radiation units* - com o equipamento LI-COR "*LI-250A light meter*" na posição dos frascos, porém em água proveniente da torneira, para evitar contaminação do equipamento. Já a temperatura ambiente foi controlada em  $24,5^\circ\text{C}$  ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ) com aparelho de climatização de ar comum. Os frascos foram mantidos sob aeração constante,  $3,2 \text{ Lmin}^{-1}$  em cada frasco.

##### 4.4.2 Condições específicas

Nos experimentos preliminares, EXP1-EXP2-EXP3, as condições luminosas foram iguais, sendo o fotobiorreator separado em três zonas luminosas, intituladas como Frente, Meio e Fundo. Foram utilizadas simultaneamente lâmpadas LED de espectro branco e colorido.

Já no experimento EXP4, dividido em três bateladas, o fotobiorreator foi constituído por uma única zona luminosa homogênea. Em cada batelada foi utilizado um regime luminoso diferente, na Batelada 1 foram utilizados os LED brancos + coloridos, na Batelada 2 apenas os LED brancos e na Batelada 3 apenas os LED coloridos. No experimento 5 foi utilizada apenas a iluminação colorida, da mesma maneira que o EXP4 tratamento Colorido.

Durante o período escuro ambos os experimentos apresentaram luminosidade igual a zero LUX.

Os dados de luminosidade do período claro estão discriminados na tabela 3.

**Tabela 4.** Detalhamento da intensidade luminosa na fase clara dos experimentos.

Experimento	Zona	Média PAR ( $\mu\text{mols}^{-1}$ )	Média Lux	Faixa de cor predominante
EXP1 – EXP2 – EXP3	Frente	480 $\pm$ 40	3.176 $\pm$ 666	Mista
	Meio	817 $\pm$ 47	9.910 $\pm$ 435	Colorida
	Fundo	687 $\pm$ 115	4.083 $\pm$ 478	Branca
EXP4 (Batelada 1)	Única	1.122 $\pm$ 111	10.736 $\pm$ 2.798	Mista
EXP4 (Batelada 2)	Única	335 $\pm$ 12	5.332 $\pm$ 2.407	Branca
EXP4 (Batelada 3)	Única	799 $\pm$ 73	10.210 $\pm$ 2552	Colorida
EXP5	Única	799 $\pm$ 73	10.210 $\pm$ 2552	Colorida

#### 4.5 Coletas experimentais e métodos analíticos

Durante cada experimento os dias foram identificados de D0 (dia zero) a D7 (dia sete) ou D10 no EXP5, sendo o inóculo realizado em D0. As coletas foram realizadas em horário padrão, uma vez por dia, foram coletadas de 15 mL a 65 mL dependendo das análises que seriam realizadas no dia, através de seringa e tubo de vidro.

As análises realizadas foram contagem de células (CONT), leitura da absorvância (ABS) em 540 nm, 680 nm e 750 nm, fluorescência (FLUO), peso seco (BS), fósforo total (PT) e nitrogênio total (NT). No EXP5 ainda foi realizado quantificação de Carbono Total, Carbono Orgânico, Carbono Inorgânico, acompanhamento do pH e contagem de bactérias.

No experimento 3 excepcionalmente foi realizada análise de metais pesados no efluente bruto. As análises foram feitas nos dias demonstrados na tabela 4 para os EXP 1 a 4 e na tabela 5 para o EXP5. Os experimentos 1 a 3 foram realizados em triplicatas, enquanto as bateladas do experimento 4 e o experimento 5 foram realizadas em quintuplicatas.

**Tabela 5.** Ensaios laboratoriais EXP1 A EXP4.

Análise	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
CONT	X			X	X	X	X	X
ABS	X			X	X	X	X	X
FLUO	X			X	X	X	X	X
BS						X		X
PT	X			X				X
NT	X			X				X

**Tabela 6.** Ensaios laboratoriais EXP5.

Análise	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
CONT	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
ABS	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FLUO	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BS						X		X			X
pH	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
PT	X					X	X	X			X
NT	X					X	X	X			X
Carbono	X					X	X	X			X
Bactérias	X			X		X		X			X

Nos EPX1 a EXP4 nos D1 e D2 não foram realizadas coletas nem análises, apenas monitorado o sistema contra qualquer falha, vazamento ou problemas possíveis, isso se deve ao período de LAG do sistema, em que as microalgas estão se adaptando aos fatores bióticos e abióticos do sistema, resultando em pouco crescimento e remoção de nutrientes.

#### 4.5.1 Contagem de células

Para a contagem de células foram utilizadas alíquotas diárias de 900  $\mu\text{L}$  adicionadas a 100  $\mu\text{L}$  de fixador (10 % V/V de formol acrescido de 5 % de glicerol), quando necessário as amostras eram diluídas em água de osmose reversa para possibilitar a contagem.

A contagem foi realizada na câmara de Fuchs-Rosenthal, seguindo a metodologia padrão de contagem. A câmara de contagem é preenchida com amostra e então aguarda-se cerca de 4 minutos até as células assentarem na parte inferior da câmara. Dessa forma então foram contados 16 setores ou 64 setores na diagonal em cada compartimento da câmara,

dependendo da quantidade de células, e a média obtida era multiplicada por 78,125. Dessa maneira calcula-se a média de células  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.5.2 Absorbância total

A absorbância total foi realizada com uso do equipamento Espectrofotômetro Nanocolor VIS I da marca MN. As análises foram realizadas logo após coleta no sistema, homogeneizadas por meio de agitação manual e as leituras foram realizadas em cubetas de vidro com caminho óptico de 10 mm nos comprimentos de onda de 540 nm, 680 nm e 750 nm.

#### 4.5.3 Espectrofotometria de Fluorescência azul

A análise de Espectrofotometria de fluorescência azul foi realizada com o aparelho Fluorômetro Trilogy da marca Turner Designs.

#### 4.5.4 Peso seco

O peso seco foi medido mediante avaliação de sólidos suspensos totais – SST -. Para realização da análise foram pesados filtros de fibra de vidro com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  e então filtrados 50 ml de amostra em filtro a vácuo. O material filtrado foi seco durante 24 h a 60 °C e então seco por 1 h a 105 °C. Após esse processo, os filtros foram colocados em dessecador até atingir temperatura ambiente e então foram pesados e o processo repetido novamente por 1 h a 105 °C até estabilização do peso.

Para o cálculo foi realizada uma medida zero em D0 e então subtraído dos valores de SST das amostras. Não foram encontrados valores relevantes de outros sólidos suspensos totais.

#### 4.5.5 Verificação pH

A verificação de pH foi realizada diariamente em dois momentos, logo antes do início da fase clara e logo antes do início da fase escura. Para que os valores extremos de pH fossem alcançados. O pH foi verificado com o pHmetro de bancada modelo QX1500 da marca Qalxtron. O aparelho foi calibrado diariamente com as soluções padrões antes da primeira medição do dia.

#### 4.5.6 Quantificação de Fósforo Total

A quantificação de fósforo total foi realizada conforme protocolo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (EATON *et al.*, 2005) código 4500-P E *ascorbic acid method*. O protocolo prevê a digestão das amostras em autoclave a 105 °C durante 30 minutos para conversão dos compostos de fósforo – orgânico e inorgânico – em ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) que por sua vez pode ser determinado pelo método colorimétrico de redução com ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) e aferido mediante de curva padrão realizada com fosfato monobásico de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (EATON *et al.*, 2005).

#### 4.5.7 Quantificação de Nitrogênio Total

A quantificação de nitrogênio total foi realizada conforme protocolo disponível pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (EATON *et al.*, 2005) código 4500-N C *persulfate method*. O protocolo prevê digestão das amostras para conversão do nitrogênio orgânico em nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Após a digestão, o nitrogênio total na forma de nitrato, é mensurado mediante leitura no espectrofotômetro e curva padrão realizada com ácido glutâmico ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$ ).

Para este protocolo foi utilizado kit de quantificação de nitrogênio *Spectroquant nitrate test* da marca Merk.

#### 4.5.8 Quantificação de Carbono

A quantificação de carbono total foi realizada pelo Laboratório de Tratamento Avançado de Reuso de Águas – LATAR – da Universidade de São Paulo – USP – e foi mensurado por meio do método da combustão a alta temperatura para Carbono total e Carbono inorgânico total. O carbono orgânico total foi inferido pelo balanço de massas. (EATON *et al.*, 2005).

#### 4.5.9 Índices produtivos

Para cálculo dos índices produtivos de velocidade específica de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ ) (CE) e Tempo de duplicação (d) (TD) foram usadas as equações abaixo.

$$CE = \frac{\ln \frac{C_0}{C_x}}{T} \quad \text{Equação 1. Velocidade específica de crescimento.}$$

Onde:

$C_0$  = Contagem de células  $\text{mL}^{-1}$  no início da fase LOG;

$C_x$  = Contagem de células  $\text{mL}^{-1}$  ao final da fase LOG;

T = Duração da fase LOG em dias.

$$TD = \frac{\ln 2}{CE} \quad \text{Equação 2. Tempo de duplicação.}$$

Onde:

CE = Velocidade específica de crescimento.

#### 4.5.10 Metais pesados

A análise de metais pesados foi realizada pela empresa SG Soluções Científicas. Para as determinações de Chumbo, Cádmiu, Cromo, Mercúrio, Arsênio, Selênio, Bário, Cobre e Ferro nas amostras foi utilizado técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma acoplado indutivamente (*Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP OES).

#### 4.5.11 Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para contagem da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi utilizado protocolo de coliformes totais para análise de esgoto com técnica de “*Spread plate*” (OLIVEIRA, 2012). Para realização dos ensaios foi utilizado o meio de cultura *Chromocult Coliform Agar* da marca Merk. O meio de cultura foi inoculado e incubado por 24 horas a 37 °C.

Este método apresenta crescimento tanto de coliformes totais como específico para *E. coli*, dessa forma as colônias com coloração vermelha foram consideradas como coliformes e as colônias violeta como *E. coli*. Para o termo Coliformes totais foram contabilizadas as contagens de coliformes somadas a contagem de *E. coli*. O resultado foi expresso em Unidades formadoras de colônias por mL – UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

#### 4.6 Estatísticas

Para testes de médias dos tratamentos foi utilizado teste ANOVA, quando encontradas diferenças significativas foi utilizado o teste de Tukey para comparação entre médias, ambos

com intervalo de confiança de 95 %. As estatísticas foram feitas no Software aberto “*R Project*” versão 4.2.2. Os gráficos foram gerados pelo software Origin 8, versão Origin 8.5.0 SR1 da empresa OriginLab Corporation.

## 5. Resultados

### 5.1 Considerações preliminares

É importante destacar que o calendário experimental foi dividido em duas fases, a primeira, contendo os experimentos 1 a 3, foi considerada uma fase exploratória, utilizada para compreender fatores limitantes do sistema e mediante análises quantitativas e qualitativas e percepções empíricas, propor mudanças no fotobiorreator. Os experimentos 1 a 3 apresentam uma breve conclusão individual para que a linha de pensamento das mudanças do fotobiorreator seja compreensível. Discussão e conclusões mais elaboradas serão encontradas nas sessões seguintes.

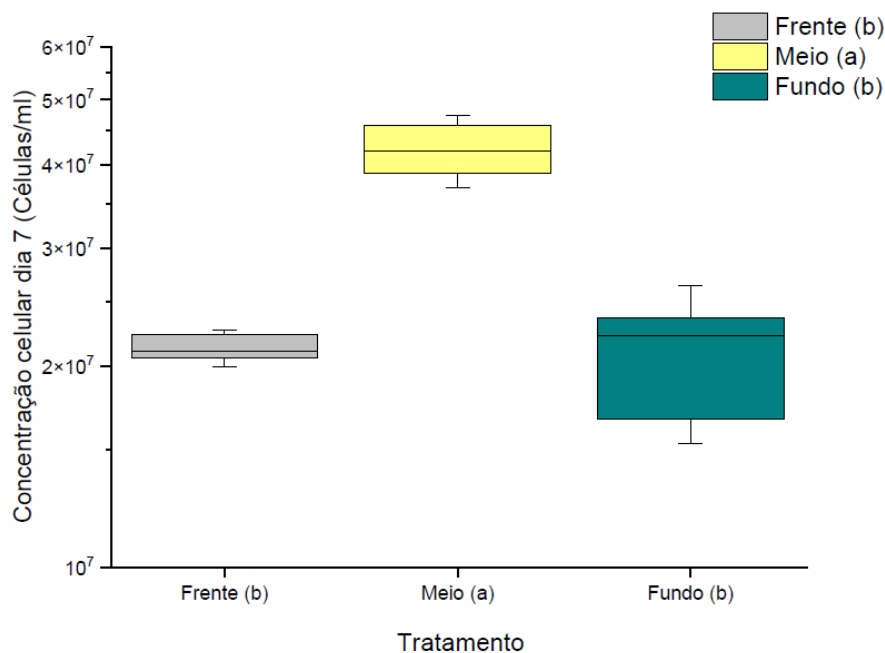
A segunda fase foi constituída pelo experimento 4, dividido em três bateladas, no qual após alterações na parte relacionada a iluminação do fotobiorreator foram testados três diferentes tratamentos luminosos e pelo experimento 5 em que foi testada a adição de carbono inorgânico na forma de CO<sub>2</sub> no cultivo.

### 5.2 Fase Exploratória

#### 5.2.1 Experimento 1

Para o primeiro experimento, o fotobiorreator foi dividido em 3 tratamentos, fileira Frente, fileira Meio e fileira Fundo, todos em triplicata. E a hipótese era de que o tratamento Meio apresentava melhor crescimento e remoção de nutrientes devido à melhor exposição à luz.

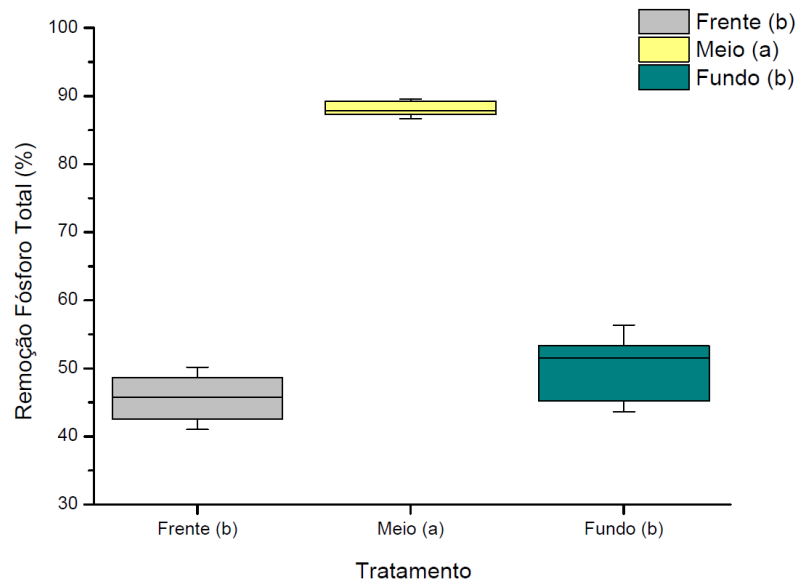
Em relação ao crescimento, o tratamento Meio foi o que apresentou maior concentração de células mL<sup>-1</sup> ao final dos sete dias de experimento, como observado na figura 12.



**Figura 12.** Concentração celular no dia 7 do EXP1 nas diferentes posições dentro do fotobiorreator. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.

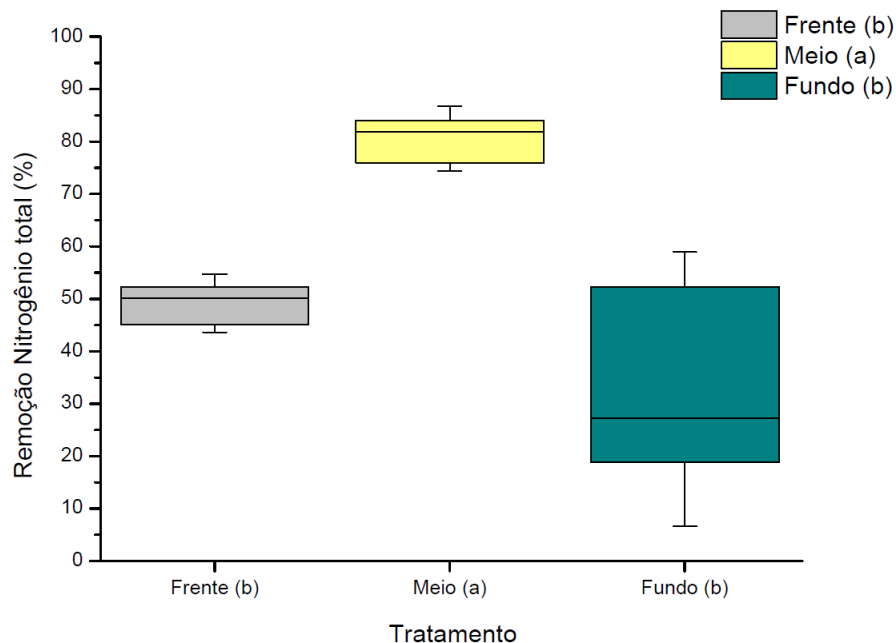
O tratamento do meio apresentou média de  $4,5 \times 10^7$  células $\text{mL}^{-1}$ , sendo estatisticamente diferente, enquanto os tratamentos frente e fundo apresentaram  $2,12 \times 10^7$  células $\text{mL}^{-1}$  e  $2,08 \times 10^7$  células $\text{mL}^{-1}$  respectivamente, não apresentando diferença estatística entre eles.

A remoção de fósforo total (Figura 13) dos sistemas apresentou resultado similar ao do crescimento, tendo o tratamento Meio apresentando diferença estatística, retirando 88 % do fósforo total, enquanto os tratamentos Frente e Fundo retiraram 46 % e 50 % respectivamente, não apresentando diferença estatística.



**Figura 13.** Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP1 em %. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.

Para a remoção do Nitrogênio total, apresentada na figura 14, o tratamento Meio retirou 81 %, tratamento Frente 49 % e o tratamento fundo 33 %.



**Figura 14.** Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP1 em %. Letras diferentes representam diferença estatística (>95 % de confiança). N amostral/tratamento = 3.

### Conclusões Parciais referentes ao Experimento 1

O cultivo de microalgas em efluente de esgoto mostrou-se viável na configuração inicial do fotobiorreator, porém diferenças significativas de crescimento e remoção de

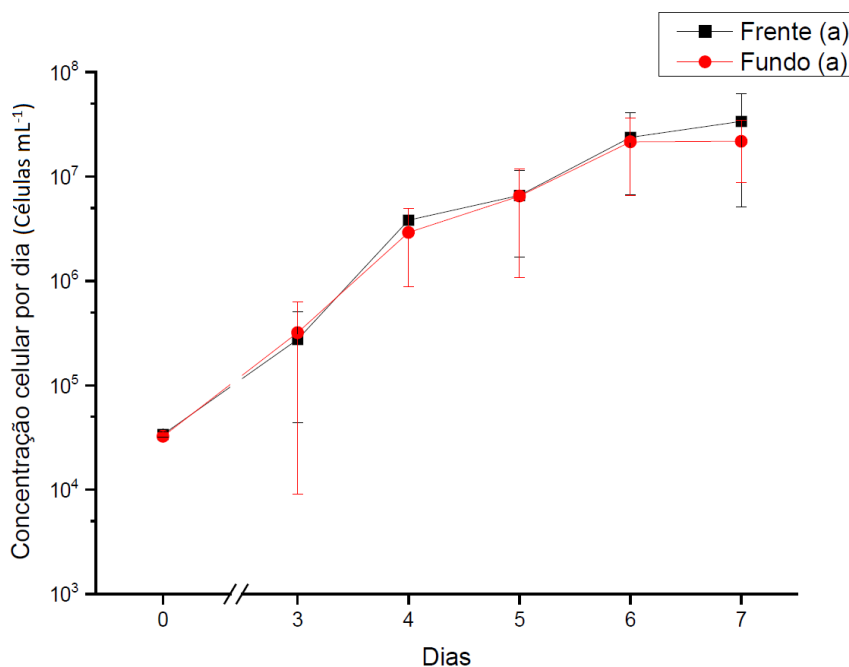
nutrientes foram encontradas, sendo o tratamento Meio responsável pelo maior crescimento,  $4,5 \times 10^7$  células/mL e maior remoção de fósforo e nitrogênio, respectivamente 88 % e 81 % da remoção total desses nutrientes. Pode-se concluir que existe uma diferença significativa entre as posições dos frascos dentro do fotobiorreator.

### 5.2.2 Experimento 2

Para o experimento 2, pensou-se em testar as mesmas condições do Experimento 1, porém apenas com os tratamentos Frente e Fundo, para identificar se o tratamento Meio exercia influência sobre os outros, como sombreamento e afins. A hipótese era de que não haveria diferença entre os tratamentos.

Desta forma foram analisados crescimento celular, remoção de nutrientes totais e biomassa seca dos dois tratamentos. Não foi possível encontrar diferença estatística entre os dois tratamentos.

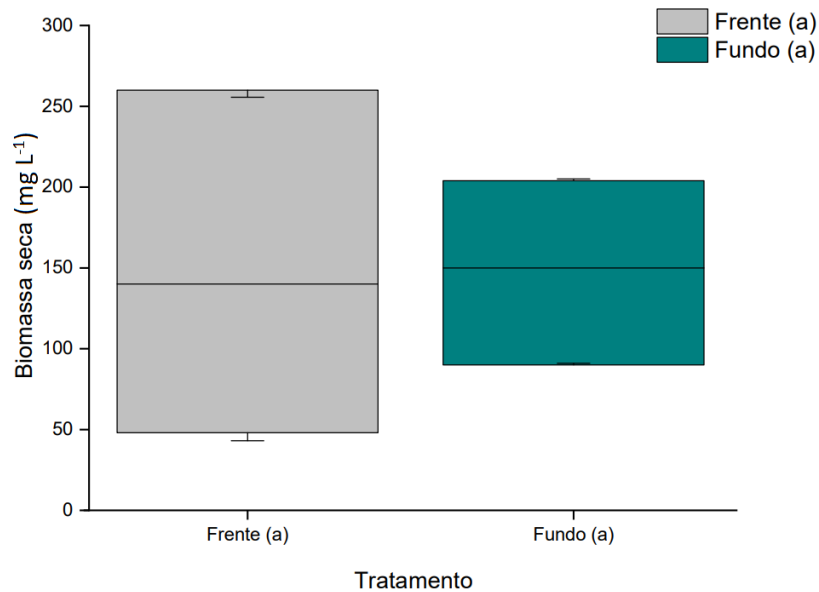
Para o crescimento celular, representado na figura 15, não houve diferença estatística. A concentração celular final do Tratamento Frente foi de  $3,3 \times 10^7$  células/mL e do tratamento Fundo  $2,1 \times 10^7$  células/mL.



**Figura 15.** Curva de concentração celular EXP2 por dia. Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.

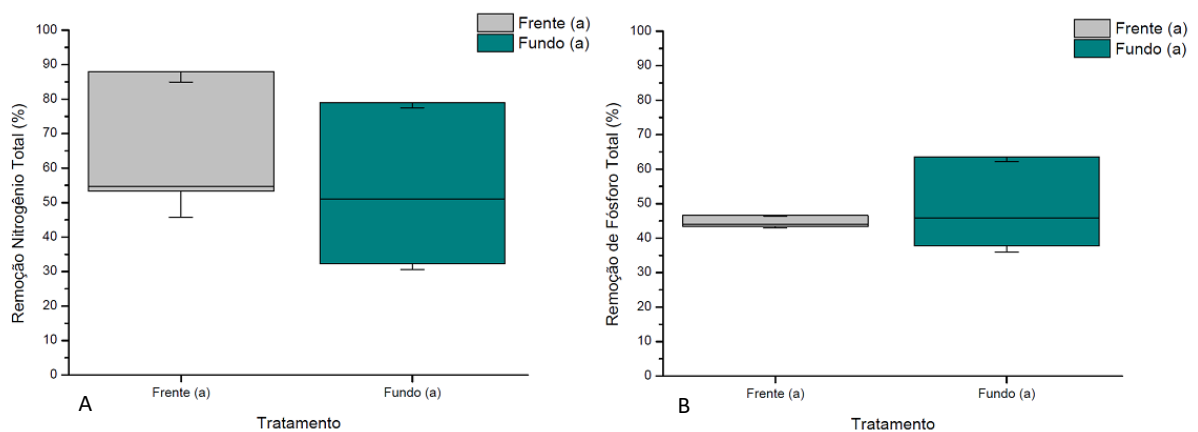
Em relação a Biomassa seca – não realizada no experimento 1 – os tratamentos também obtiveram concentração final semelhante. O tratamento frente produziu  $149 \text{ mgL}^{-1}$

de biomassa seca. Já o tratamento Fundo produziu  $148 \text{ mgL}^{-1}$  de biomassa seca. Como pode ser observado na figura 16.



**Figura 16.** Biomassa seca no dia 7 do EXP2 em  $\text{mgL}^{-1}$ . Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.

A remoção de nutrientes também foi estatisticamente igual, tanto para Nitrogênio total, como para Fósforo Total. Dados apresentados na figura 17.



**Figura 17.** (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP2 em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP2 em %. Letras iguais não apresentam diferença estatística. N amostral/tratamento = 3.

## Conclusões Parciais referentes ao Experimento 2

As posições Frente e Fundo do Fotobiorreator apresentaram resultados semelhantes aos do Experimento 1, novamente não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos no que diz respeito a crescimento celular e remoção de nutrientes. Entende-se que o tratamento Meio do Experimento 1 não exercia influência sobre os resultados encontrados nos tratamentos Frente e Fundo.

### 5.2.3 Experimento 3

No experimento 3 foi realizado teste de esgoto tratado de três diferentes Estações de tratamento de esgoto, conforme descrito nos materiais e métodos.

O objetivo desse experimento foi encontrar o efluente mais propício para uso como meio de cultivo, visto que o efluente proveniente da ETE da cidade de Bauru - SP havia acabado e seria pouco prático depender do fornecimento deste efluente devido a distância entre as cidades.

Dessa forma foram testados 3 efluentes de três Estações de Tratamento de esgoto da cidade de São Carlos – SP.

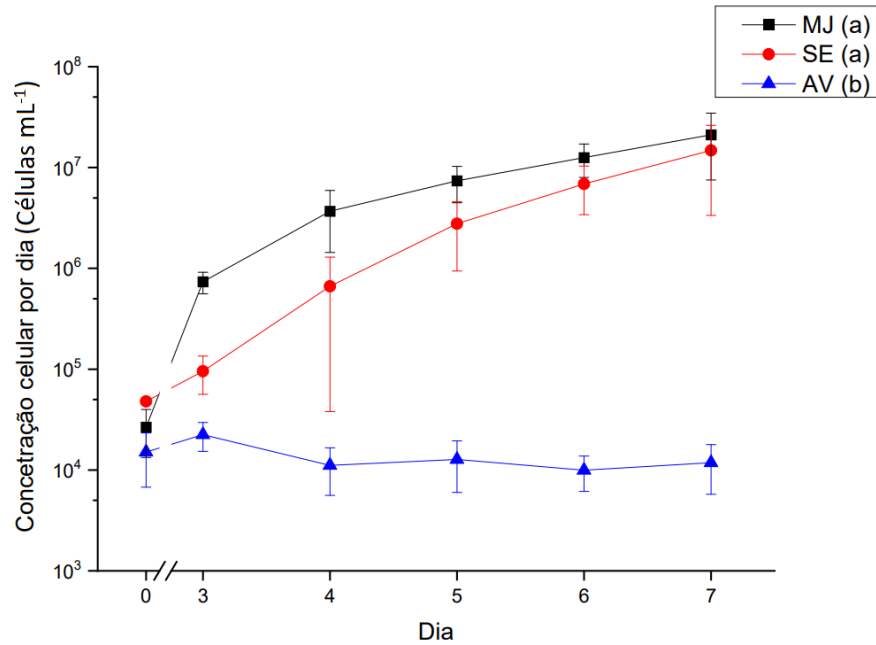
**Tabela 7.** Concentração de metais pesados nas amostras de efluentes do Monjolinho, Santa Eudóxia e Água Vermelha. Quantidades em  $\text{mgL}^{-1}$ .

Amostra	Pb	Cd	Cr	Hg	As	Se	Ba	Cu	Fe
Monjolinho (MJ)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0,043	ND*	0,057
Santa Eudóxia (SE)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0,027	ND*	0,676
Água Vermelha (AV)	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	0,049	0,092	1,380

ND\* = Não detectado.

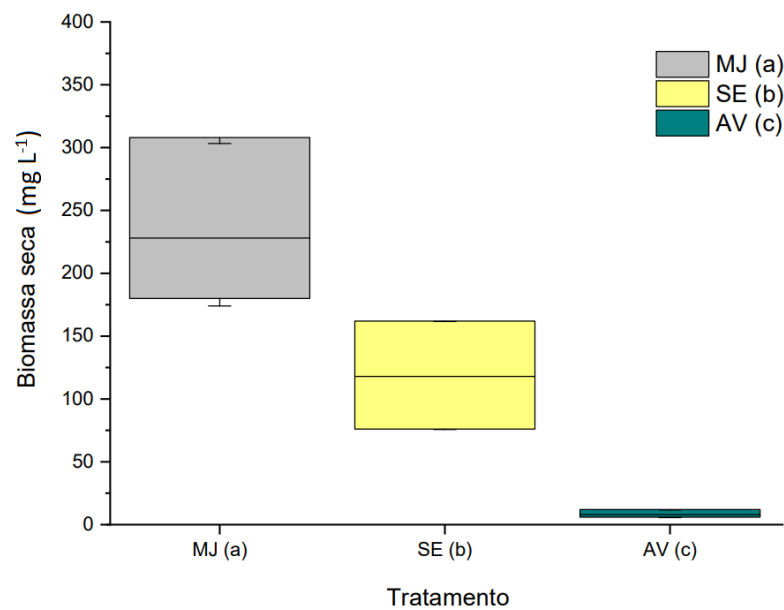
O tratamento que utilizou efluente de Água vermelha não apresentou crescimento e nem remoção de nutrientes significativos. O efluente apresentou alta concentração de Cobre,  $0,092 \text{ mgL}^{-1}$ . Segundo a literatura, concentrações de cobre a partir de  $0,002 \text{ mgL}^{-1}$  causam diminuição nas taxas de crescimento. Foi encontrada diminuição nos parâmetros de crescimentos de *Kirchneriella obesa* de acordo com o aumento da concentração de cobre (DEXTRO, 2019). Foi demonstrado que o metal causa danos oxidativos nas células devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao decréscimo da divisão celular e concentração de clorofila *a* (PINTO, 2003).

Para o crescimento celular no dia 7, o tratamento MJ apresentou média de  $2,1 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$  e o tratamento SE  $1,4 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. Apresentado na figura 18.



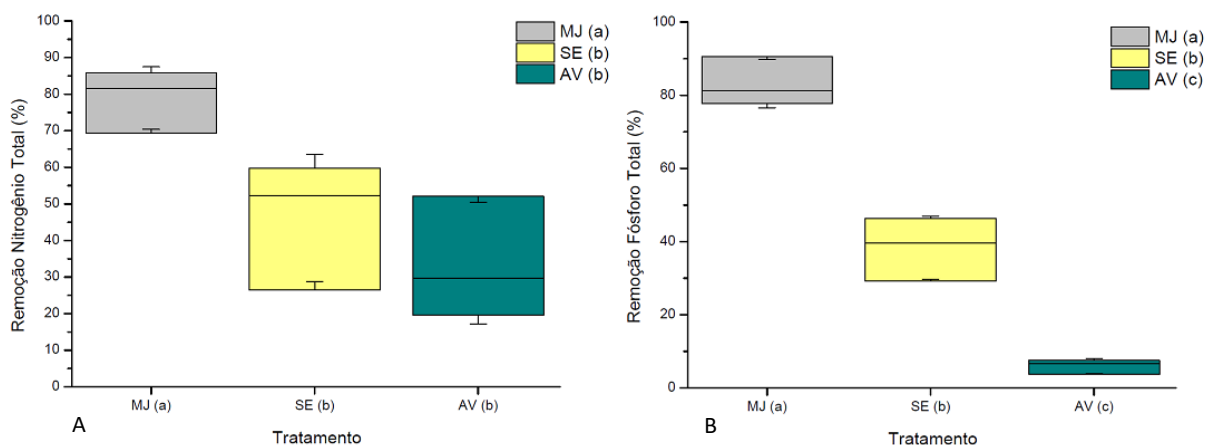
**Figura 18.** Curva de concentração celular EXP3 em células mL<sup>-1</sup>. Esgoto proveniente Água Vermelha (AV), Esgoto proveniente Monjolinho (MJ) e Esgoto proveniente Santa Eudóxia (SE). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% confiança). N amostral/tratamento = 3.

Representada na figura 19, a microalga apresentou concentração final de 239 mgL<sup>-1</sup> de biomassa seca no tratamento MJ, enquanto o tratamento SE alcançou 119 mgL<sup>-1</sup> e o tratamento AV 9 mgL<sup>-1</sup>. Foi encontrada diferença estatística nas produções de biomassa seca entre os tratamentos.



**Figura 19.** Biomassa seca dia 7 EXP3 em mgL<sup>-1</sup>. Esgoto proveniente Água Vermelha (AV), Esgoto proveniente Monjolinho (MJ) e Esgoto proveniente Santa Eudóxia (SE). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3.

A remoção de nutrientes foi diferente entre os tratamentos, tendo o tratamento MJ apresentado a melhor taxa de remoção de ambos os nutrientes, sendo 83 % e 79 % para remoção de Fósforo total e remoção de Nitrogênio total respectivamente. O tratamento SE apresentou remoção máxima de 38 % e 46 % para remoção de Fósforo total e remoção de Nitrogênio total respectivamente. Resultados apresentados na figura 20.



**Figura 20.** (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 do EXP3 em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 do EXP3 em %. Esgoto proveniente de Monjolinho (MJ), esgoto proveniente de Santa Eudóxia (SE) e esgoto proveniente de Água Vermelha (AV). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 3.

### 5.3 Fase Analítica

#### 5.3.1 Considerações iniciais

Após a realização dos três experimentos exploratórios, foi decidido em reunião com a empresa fornecedora do equipamento o ajuste do fotobiorreator em relação a iluminação e funcionamento do mesmo.

A disposição das lâmpadas foi alterada, tornando o ambiente mais homogêneo, já não mais com três zonas foto luminosas, além disso, foi feita a separação elétrica das lâmpadas LED brancas e coloridas, possibilitando o funcionamento de ambas simultaneamente ou em regimes separados.

Dessa forma, foi realizado o experimento 4, dividido em três bateladas, cada uma com 10 frascos por tratamento, aumentando a confiabilidade dos dados. Batelada 1 com todas as luzes do fotobiorreator – Branca + Colorida –(B+C), Batelada 2 apenas com os LEDs Brancos (Branco) e Batelada 3 com apenas os LEDs coloridos (Colorido).

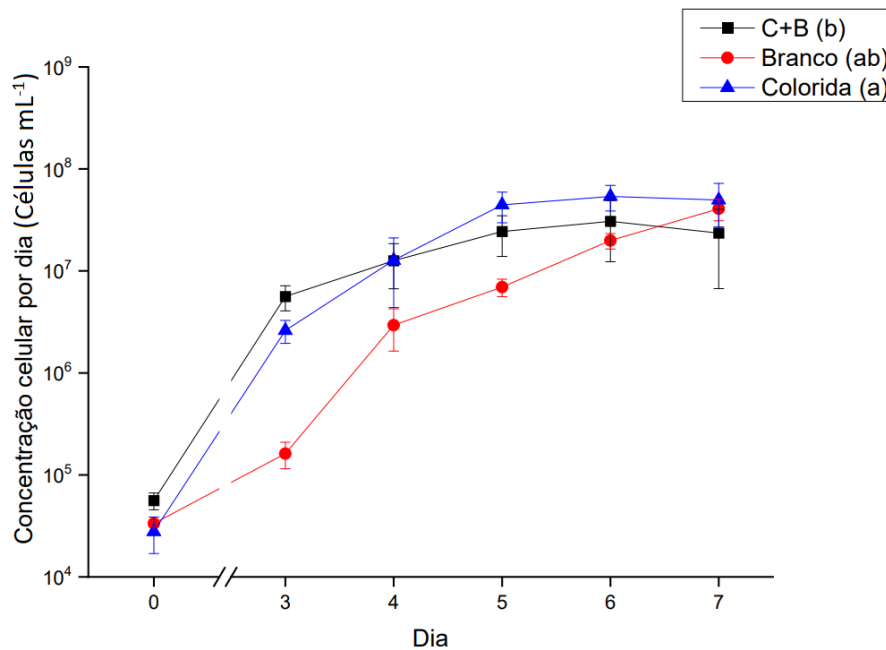
Além disso, o melhor resultado do Experimento 4 foi comparado com os resultados obtidos no experimento 3, tratamento MJ, para que fosse possível comparar os efeitos das mudanças sugeridas no fotobiorreator.

Foi também testada a adição de carbono inorgânico na forma de CO<sub>2</sub> no sistema no experimento 5.

A discussão desses experimentos está separada na sessão discussão deste trabalho.

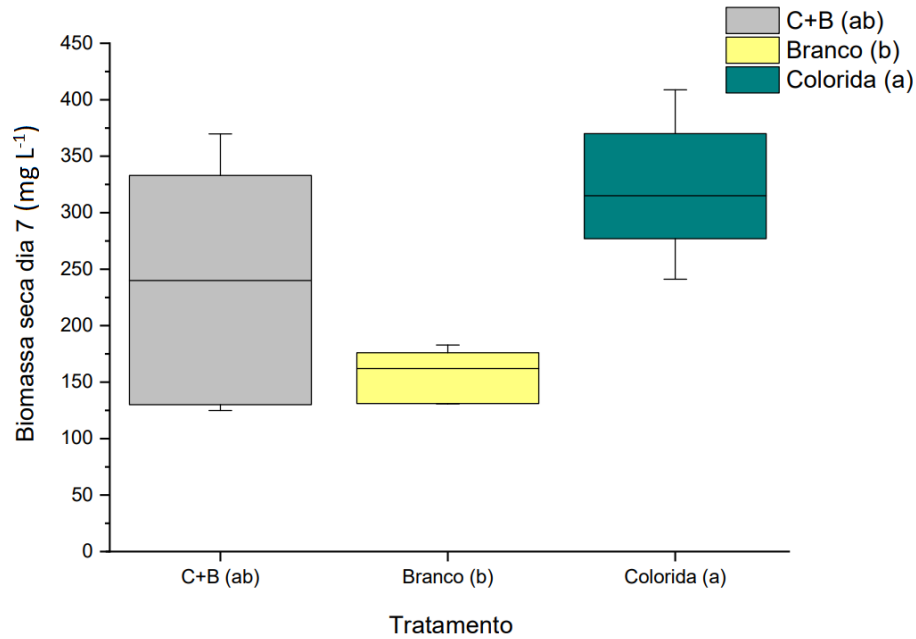
### 5.3.2 Experimento 4

Em relação ao crescimento celular (Figura 21), a maior concentração celular foi atingida pelo tratamento Colorido no dia 6, no qual já havia alcançado a fase estacionária. Porém no dia 7 os tratamentos Colorido e Branco –  $4,95 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> e  $4,07 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> respectivamente - não apresentaram diferença estatística na concentração celular, porém o tratamento Branco ainda estava em fase LOG.



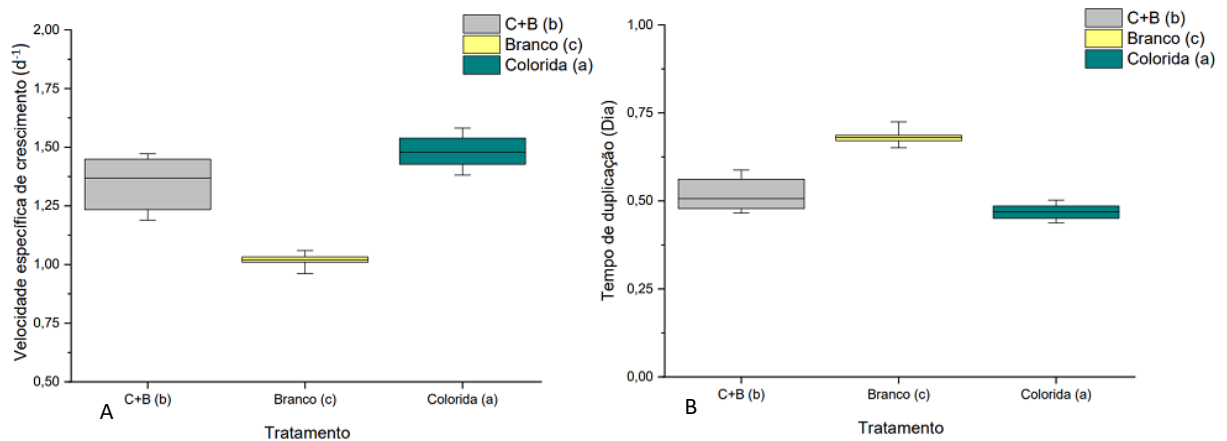
**Figura 21.** Curva de concentração celular no EXP4 por dia. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

Apesar de não apresentarem diferença na concentração celular, quando analisado a Biomassa seca é possível encontrar diferenças significativas nos parâmetros de crescimento entre os tratamentos. O tratamento B+C não apresentou diferença estatística quando comparado ao tratamento Colorido como representado na figura 22. O tratamento Colorido apresentou a maior quantidade de Biomassa Seca,  $325 \text{ mgL}^{-1}$ , tratamento B+C apresentou  $247 \text{ mgL}^{-1}$  e a menor concentração de Biomassa Seca foi proveniente do Tratamento Branco, com  $157 \text{ mgL}^{-1}$ .



**Figura 22.** Biomassa seca dia 7 EXP4 em mgL<sup>-1</sup>. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

Ainda sobre Índices Produtivos, o Tratamento Colorido foi o que apresentou melhores valores de Velocidade específica de crescimento e Tempo de Duplicação relacionados a fase LOG das bateladas que apresentaram 4 dias no Tratamento B+C, 7 dias no Tratamento Branco e 5 dias no Tratamento Colorido. Demonstrados na figura 23 e tabela 7.

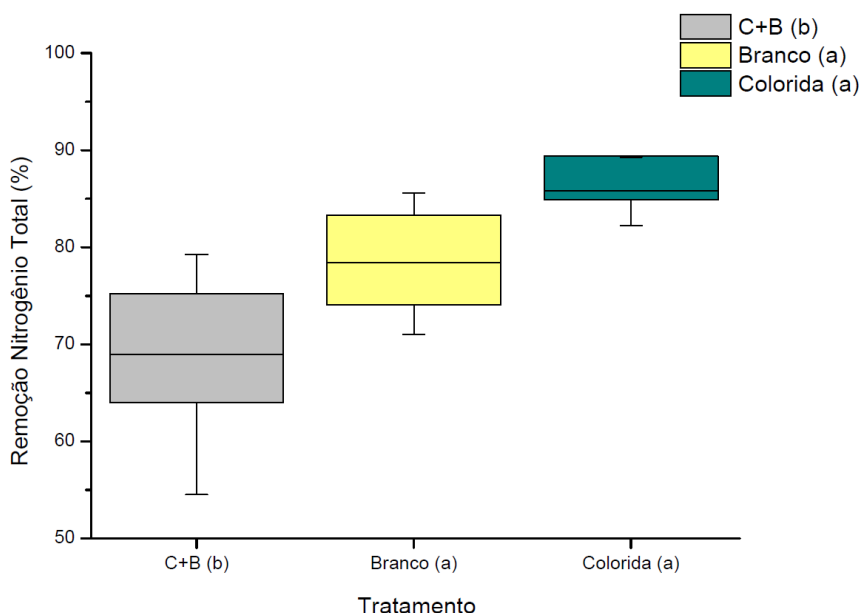


**Figura 23.** (A) Boxplot índice de Velocidade específica de crescimento em d<sup>-1</sup> EXP4 ao final da fase LOG. (B) Boxplot tempo de duplicação em dia EXP4 ao final da fase LOG. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

**Tabela 8.** Compilação de índice de velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação do EXP4 ao final da fase LOG. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

Tratamento	Velocidade específica de crescimento ( $d^{-1}$ )	Tempo de duplicação (d)
B+C	$1,33 \pm 0,14^B$	$0,52 \pm 0,06^B$
Branco	$1,01 \pm 0,04^C$	$0,68 \pm 0,03^C$
Colorido	$1,48 \pm 0,10^A$	$0,46 \pm 0,03^A$

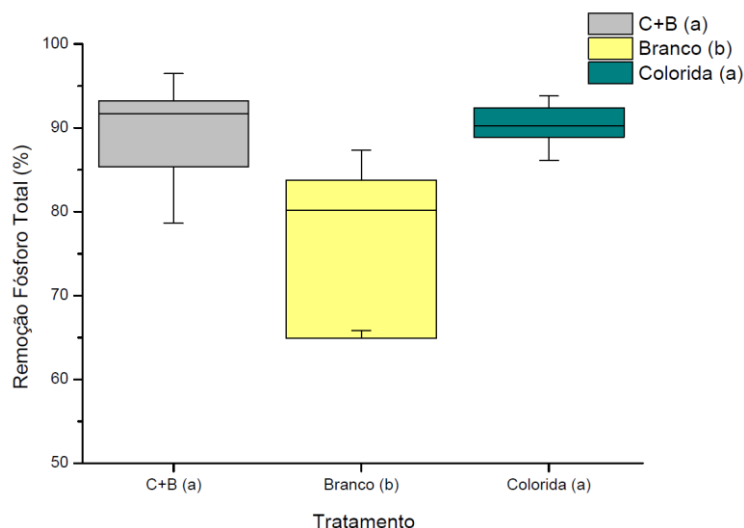
A concentração inicial de nitrogênio total do experimento 4 foi de  $17,09 \text{ mgL}^{-1}$ . Em relação a remoção de Nitrogênio total, o tratamento Colorido e Branco apresentaram as melhores remoções máximas, 85 % e 78 % respectivamente, sem diferença estatística entre os tratamentos, enquanto o tratamento B+C apresentou 67 %. Resultados demonstrados na figura 24. Desse modo o tratamento B+C apresentou uma quantidade residual de  $5,65 \text{ mgL}^{-1}$  de nitrogênio total, enquanto o tratamento Branco apresentou  $4,07 \text{ mgL}^{-1}$  e o tratamento Colorido apresentou  $2,51 \text{ mgL}^{-1}$ .



**Figura 24.** Remoção de nitrogênio total no dia 7 EXP4. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

O Experimento 4 apresentou concentração inicial de fósforo total de  $4,11 \text{ mgL}^{-1}$ . Para remoção de Fósforo total (figura 25), os tratamentos Colorido e B+C apresentaram os melhores índices de remoção, 90 % e 88 % respectivamente. E o tratamento Branco

apresentou 77 % de remoção de Fósforo total. Dessa forma a quantidade residual de fósforo total foi de  $0,72 \text{ mgL}^{-1}$  para o tratamento B+C,  $1,36 \text{ mgL}^{-1}$  para o tratamento branco e  $0,41 \text{ mgL}^{-1}$  para o tratamento colorido.



**Figura 25.** Remoção de fósforo total no dia 7 EXP4. Tratamento Colorido+branco (C+B), Tratamento Branco (Branco) e tratamento Colorido (Colorida). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 10.

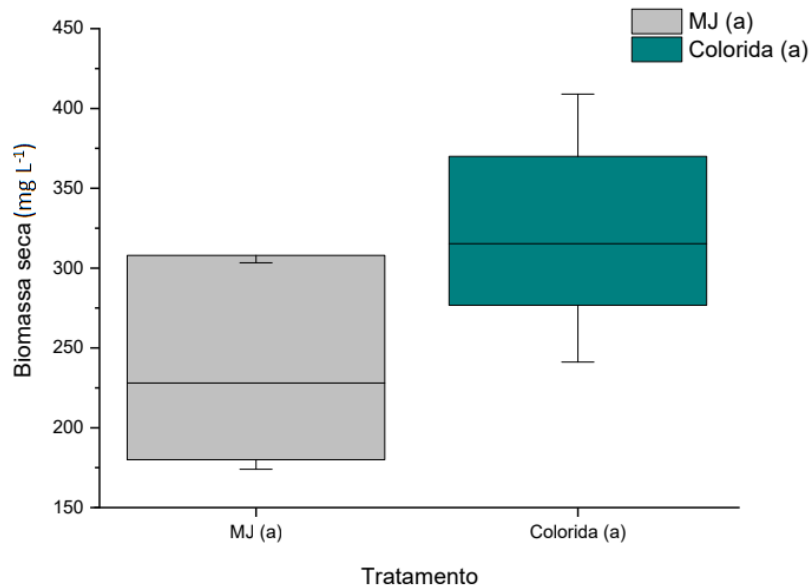
### 5.3.3 Índices produtivos e de remoção pré x pós alterações no Fotobiorreator

Os índices produtivos (Tabela 8) comparados nesta seção são referentes ao tratamento MJ do experimento 3 com o melhor tratamento do experimento 4 – Colorido -.

**Tabela 9.** Compilação Parâmetros produtivos entre os tratamentos MJ (EXP3) x Colorido (EXP4). Concentração celular final, biomassa seca, remoção de nitrogênio total, remoção de fósforo total, velocidade específica de crescimento e tempo de duplicação. Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral = 3 para tratamento Monjolinho e 10 para tratamento colorido.

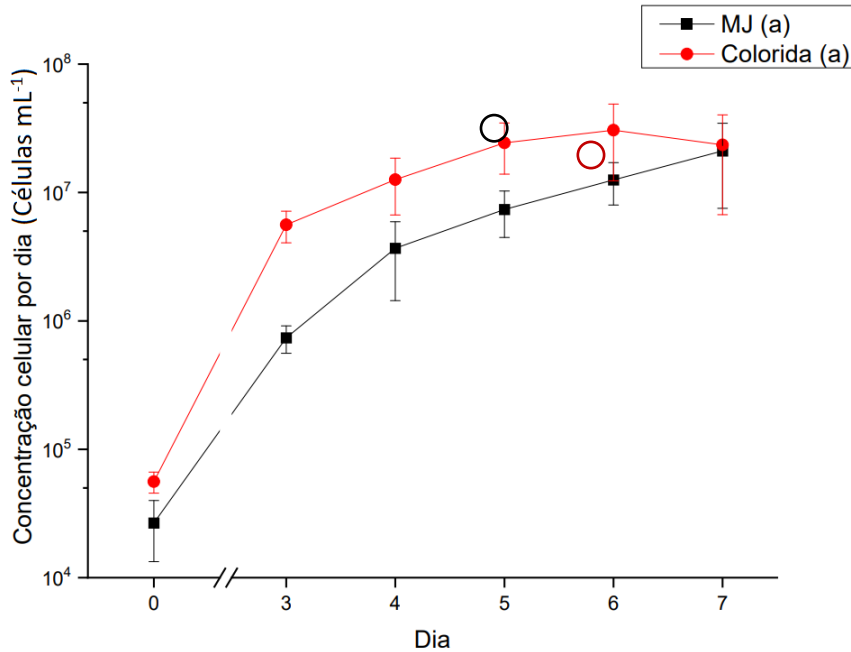
Parâmetro	Monjolinho (EXP3)	Colorido (EXP4)
Concentração Celular D7 (Células $\text{mL}^{-1}$ )	$2,10 \times 10^7 \pm 1,35 \times 10^7$ <sup>A</sup>	$4,95 \times 10 \pm 2,25 \times 10^7$ <sup>A</sup>
Biomassa seca ( $\text{mgL}^{-1}$ )	$238 \pm 65$ <sup>A</sup>	$325 \pm 84$ <sup>A</sup>
Remoção Nitrogênio Total (%)	$79,01 \% \pm 8,5 \%$ <sup>A</sup>	$84,92 \% \pm 5,6 \%$ <sup>A</sup>
Remoção Fósforo Total (%)	$83,27 \% \pm 6,6 \%$ <sup>A</sup>	$90,01 \% \pm 3,8 \%$ <sup>A</sup>
Velocidade específica de crescimento ( $\text{d}^{-1}$ )	$1,03 \pm 0,08$ <sup>B</sup>	$1,48 \pm 0,10$ <sup>A</sup>
Tempo de duplicação (d)	$0,67 \pm 0,05$ <sup>B</sup>	$0,46 \pm 0,03$ <sup>A</sup>

Os índices produtivos de concentração celular e Biomassa seca apesar de não apresentarem diferença estatística (Figura 26), quando em uma visão produtiva do sistema, apresentou um aumento total de aproximadamente 36 % na média de Biomassa seca final no tratamento colorido em relação ao tratamento MJ.



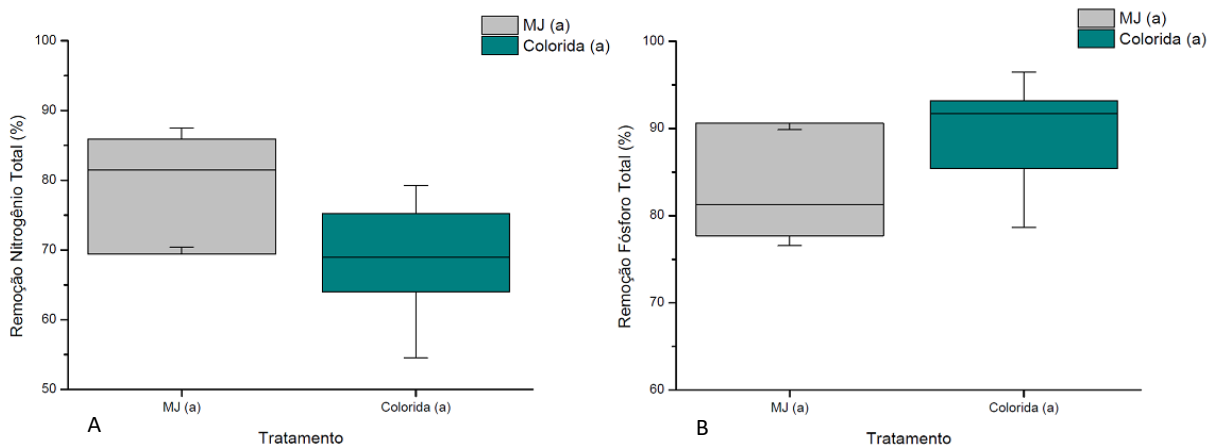
**Figura 26.** Biomassa seca dia 7 tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4). Tratamento Monjolinho do Experimento 3 (MJ) e tratamento Colorida do Experimento 4 (Colorida). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 no EXP3 e 10 no EXP4.

Os índices produtivos de Velocidade específica de crescimento e Tempo de Duplicação (Tabela 8) foram estatisticamente diferentes. O tratamento colorido apresentou Velocidade específica de crescimento de  $1,48 \pm 0,10$  por dia e tempo de duplicação  $0,46 \pm 0,03$  dia. Já o tratamento MJ apresentou Velocidade específica de crescimento de  $1,03 \pm 0,08$  por dia e tempo de duplicação  $0,67 \pm 0,05$  dia. Tratamento Colorido atinge o fim da fase LOG antes (Figura 27), em 5 dias – Colorido – contra 6 dias no tratamento MJ.



**Figura 27.** Curva de concentração celular por dia tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4). Tratamento Monjolinho do Experimento 3 (MJ) e tratamento Colorida do Experimento 4 (Colorida). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 no EXP3 e 10 no EXP4.

Apesar de não apresentar diferença estatística na remoção de nutrientes, na figura 28 é possível perceber que a remoção de nutrientes no Tratamento Colorido é mais regular. Além disso, é possível notar certa tendência de melhor remoção no tratamento Colorido devido ao menor tamanho do “box” apresentado no *boxplot* da figura 25.

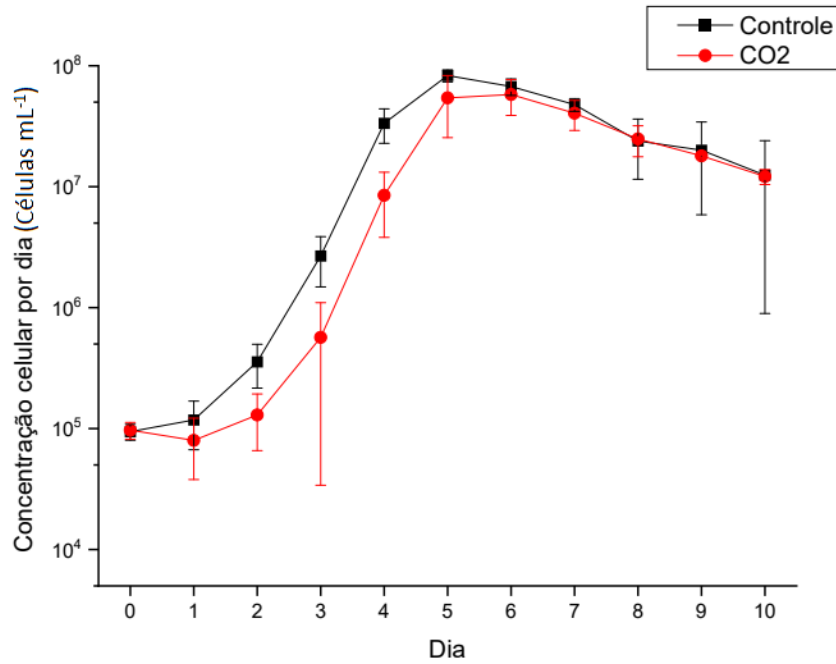


**Figura 28.** (A) Remoção de nitrogênio total no dia 7 dos tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4) em %. (B) Remoção de fósforo total no dia 7 dos tratamentos MJ (EXP3) x Colorida (EXP4) em %. Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 3 para o tratamento MJ (EXP3) e 10 no tratamento Colorida (EXP4).

### 5.3.4 Experimento 5

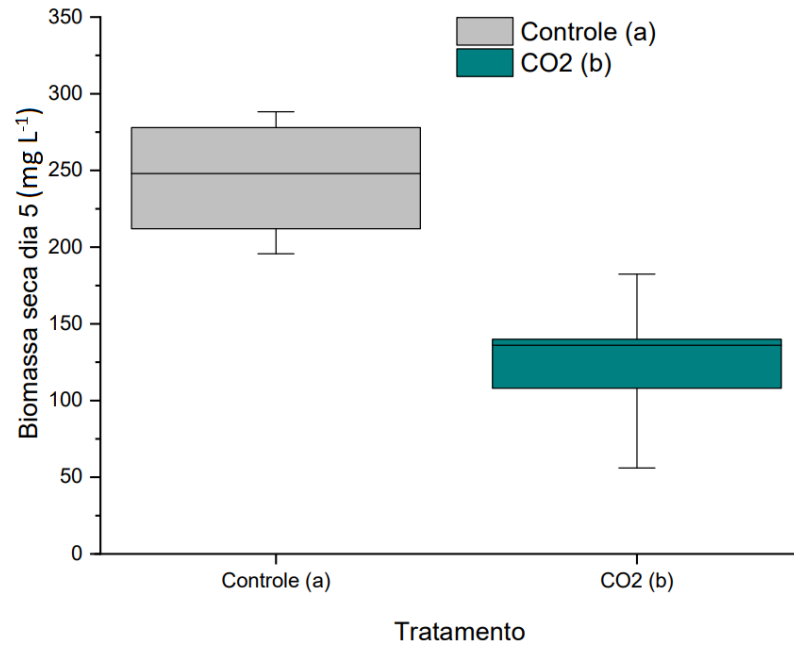
Para os parâmetros de crescimento de microalgas os tratamentos não demonstraram diferença estatística na concentração celular no início da fase de estacionária e apresentaram

mortalidade similar na fase de mortalidade. Já o tratamento controle demonstrou uma fase LOG ligeiramente mais acentuada como apresentado na figura 29.



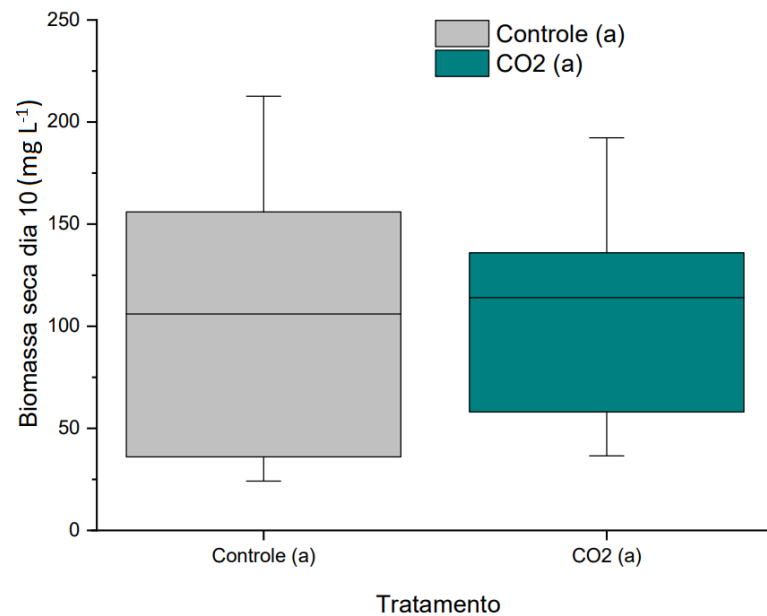
**Figura 29.** Curva de concentração celular por dia Experimento 5. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (5% V/V). N amostral/tratamento = 5.

Para a biomassa seca o resultado corrobora com os dados de concentração celular, foi encontrada diferença significativa apenas no dia 5, com o tratamento controle produzindo 248 mgL<sup>-1</sup> de biomassa seca, enquanto o tratamento CO<sub>2</sub> produziu 136 mgL<sup>-1</sup>, como apresentado na figura 30.



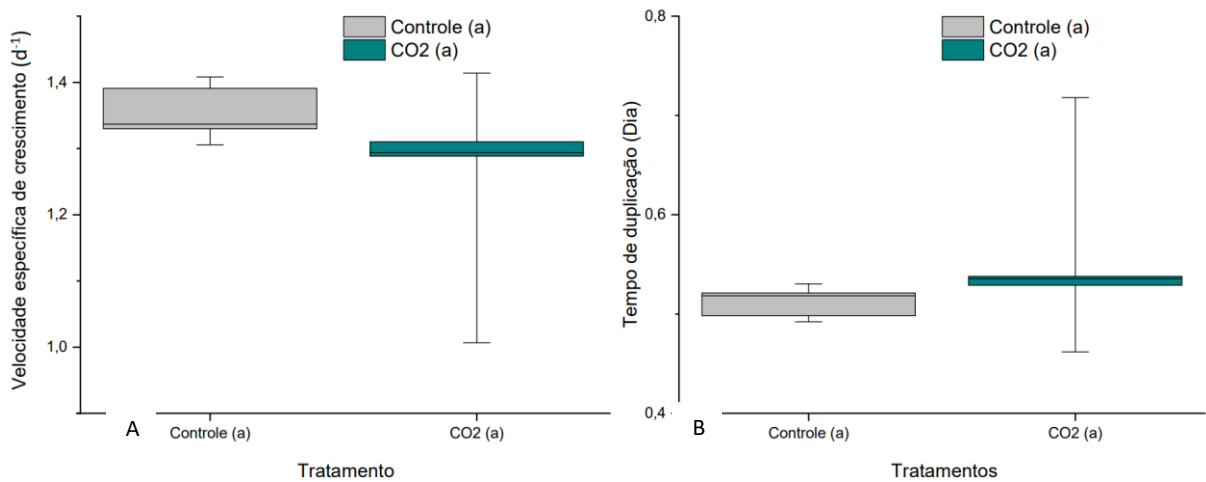
**Figura 30.** Biomassa seca Experimento 5 no dia 5 em  $\text{mg L}^{-1}$ . Tratamento controle e tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  (5% V/V). Letras diferentes apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

Porém a partir do dia 7 a diferença estatística deixou de existir e os tratamentos apresentaram um total de  $264 \text{ mg L}^{-1}$  no tratamento Controle e o tratamento  $\text{CO}_2$   $204 \text{ mg L}^{-1}$ . No dia 10 o comportamento seguiu o padrão da concentração celular, diminuindo a biomassa seca para  $106 \text{ mg L}^{-1}$  e  $114 \text{ mg L}^{-1}$  os tratamentos controle e  $\text{CO}_2$  respectivamente. Resultados apresentados na figura 31.



**Figura 31.** Biomassa seca Experimento 5 no dia 10 em  $\text{mg L}^{-1}$ . Tratamento controle e tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

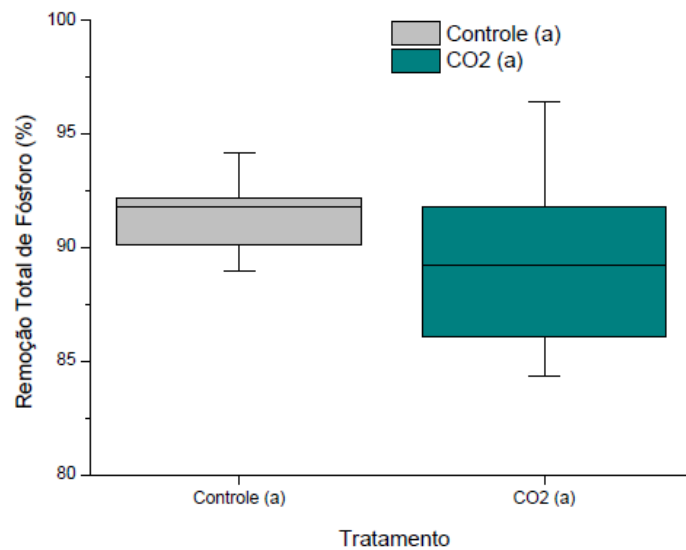
Já em relação aos índices produtivos, os tratamentos não apresentaram diferença estatística. O tratamento controle resultou em uma taxa de Velocidade específica de crescimento de  $1,34 \text{ dia}^{-1}$  e o Tratamento  $\text{CO}_2$  atingiu  $1,29 \text{ dia}^{-1}$ . Para o tempo de duplicação, o tratamento controle teve um tempo de 0,52 dias e o tratamento  $\text{CO}_2$  0,54 dias. Os resultados são dispostos na figura 32 – *Boxplot* a esquerda representa Taxa de Velocidade específica de crescimento e *Boxplot* a direita representa tempo de duplicação.



**Figura 32.** (A) Taxa de Velocidade específica de crescimento experimento 5 em  $\text{d}^{-1}$  ao final da fase LOG. (B) Tempo de duplicação experimento 5 em Dias ao final da fase LOG. Tratamento controle e tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

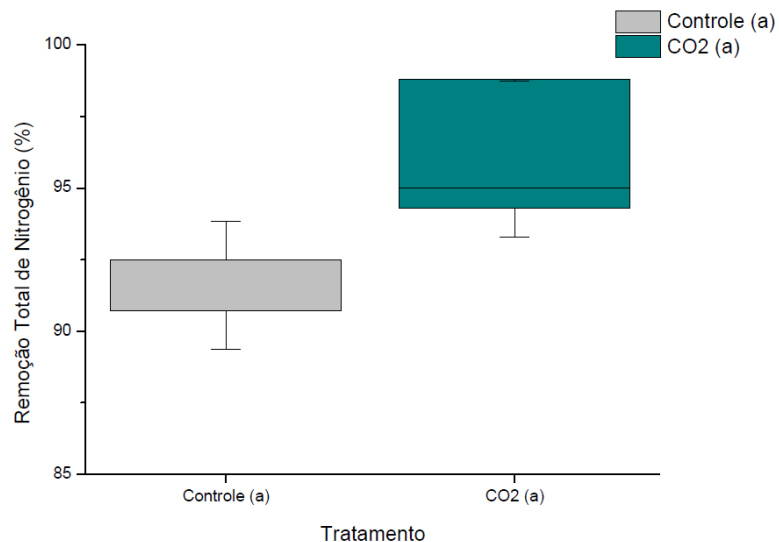
Quando analisados os parâmetros de remoção de nutrientes, os tratamentos não apresentaram diferença estatística para remoção de nutrientes totais.

A remoção de Fósforo total foi de 91,58 % para o tratamento controle, enquanto o tratamento  $\text{CO}_2$  atingiu uma média de remoção de fósforo total de 90,71 %. Apresentado na figura 33. A concentração inicial de fósforo total foi de  $1,87 \text{ mgL}^{-1}$  e foi diminuída para  $0,16 \text{ mgL}^{-1}$  para o tratamento controle e  $0,17 \text{ mgL}^{-1}$  para o tratamento  $\text{CO}_2$ .



**Figura 33.** Remoção de Fósforo total em % experimento 5 no dia 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

A concentração inicial de nitrogênio total foi de 29,43 mgL<sup>-1</sup> e a quantidade residual no fim da batelada foi de 2,46 mgL<sup>-1</sup> para o tratamento controle e 1,12 mgL<sup>-1</sup> para o tratamento CO<sub>2</sub>. Para a remoção total de nitrogênio também não houve diferença estatística, com o tratamento controle atingindo 91,65 % de média de remoção e o tratamento CO<sub>2</sub> 96,20 %. Dados apresentados na figura 34.



**Figura 34.** Remoção de nitrogênio total em % no experimento 5 no dia 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

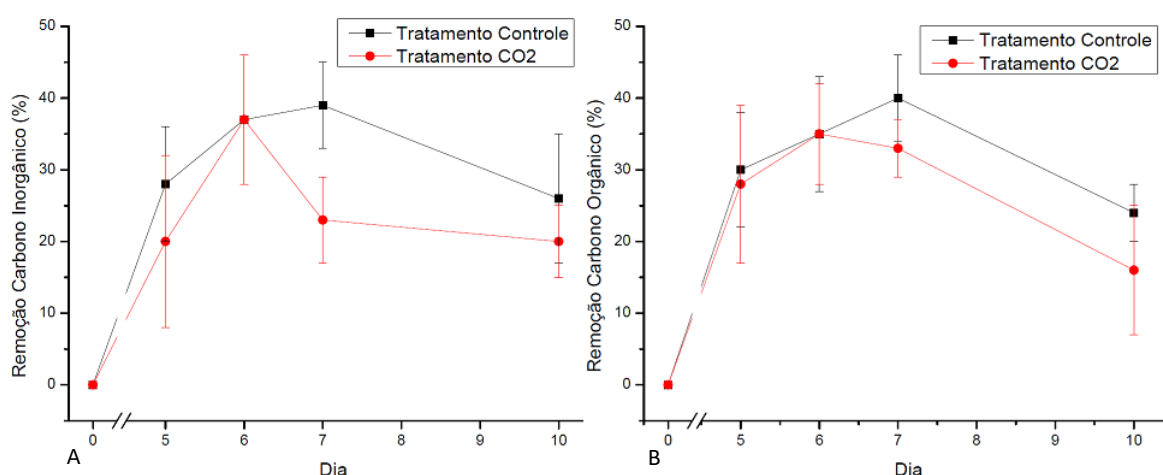
Para a remoção de Carbono, os tratamentos não apresentaram diferença estatística. Nas análises de carbono total, carbono orgânico e carbono inorgânico os tratamentos

seguiram o mesmo padrão de diminuição de remoção a partir do dia 7 como apresentado na tabela 9.

**Tabela 10.** Compilação da remoção de carbono total e carbono inorgânico em % e valores totais em  $\text{mgL}^{-1}$  nos dias 0, 5, 6, 7 e 10. Tratamento controle e tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  (5% V/V). N amostral/tratamento = 5

Dia	Tratamento Controle	Tratamento $\text{CO}_2$	Carbono Total	Carbono
			Tratamento Controle	Inorgânico Tratamento $\text{CO}_2$
Dia 0	0 %	0 %	86,28 $\text{mgL}^{-1}$	86,28 $\text{mgL}^{-1}$
Dia 5	29 %	23 %	61,42 $\text{mgL}^{-1}$	66,31 $\text{mgL}^{-1}$
Dia 6	36 %	36 %	55,48 $\text{mgL}^{-1}$	55,23 $\text{mgL}^{-1}$
Dia 7	40 %	27 %	52,05 $\text{mgL}^{-1}$	63,16 $\text{mgL}^{-1}$
Dia 10	25 %	19 %	64,54 $\text{mgL}^{-1}$	70,10 $\text{mgL}^{-1}$

Na figura 35 são apresentados os resultados de remoção de carbono orgânico e inorgânico.

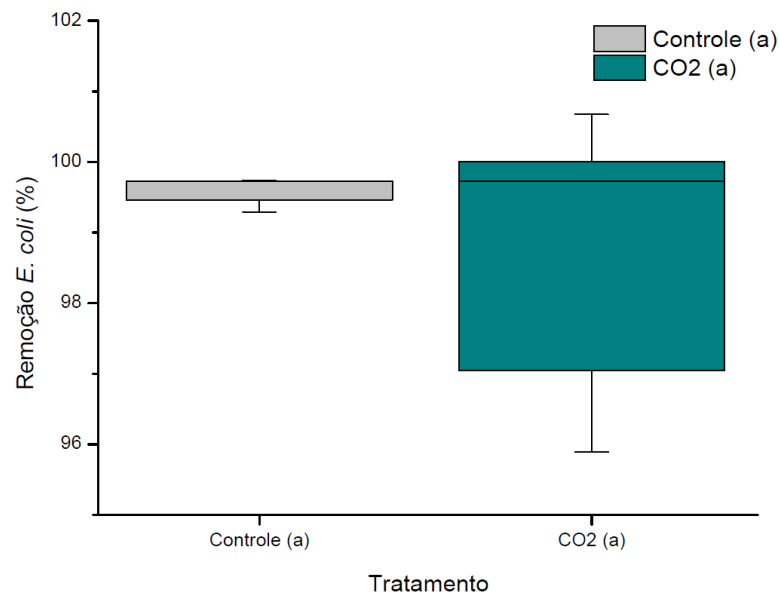


**Figura 35.** (A) Remoção de Carbono inorgânico durante o experimento em % relativa ao dia 0 (100%). (B) Remoção de Carbono orgânico durante o experimento em % relativa ao dia 0 (100%). Tratamento controle e tratamento com injeção de  $\text{CO}_2$  (5% V/V). N amostral/ tratamento = 5.

O pH não apresentou diferença significativa durante o intervalo do experimento, ficando estável entre  $7,45 \pm 0,45$  para o fim do período claro no tratamento controle e  $7,31 \pm 0,57$  para o tratamento  $\text{CO}_2$ . Já no fim do período escuro o tratamento controle atingiu média de  $7,17 \pm 0,48$  e o tratamento  $\text{CO}_2$  média de  $7,03 \pm 0,55$ .

A diminuição de contagem da bactéria *E. coli* não apresentou diferença estatística, a diminuição média das unidades formadoras de colônia do tratamento controle foi  $99,51 \% \pm$

0,22 % enquanto o tratamento CO<sub>2</sub> apresentou uma média de 98,28 ± 2,39 %, como demonstrado na figura 36.



**Figura 36.** Diminuição na contagem de unidades formadoras de colônias de bactérias *E. coli* em % no dia 10 do experimento 5. Tratamento controle e tratamento com injeção de CO<sub>2</sub> (5% V/V). Letras iguais não apresentam diferença estatística (>95% de confiança). N amostral/tratamento = 5.

## 6. Discussão

Nesta sessão serão discutidos apenas os dados do Experimento 4, do tratamento MJ do Experimento 3 em relação ao tratamento colorido do Experimento 4 e do experimento 5. Visto que as discussões e conclusões parciais dos experimentos 1 a 3 estão descritas no final de cada sessão.

É importante ressaltar que ao trabalhar com esgoto doméstico como meio de cultivo é bastante difícil estabelecer um padrão comparativo entre experimentos e resultados. Isso se deve ao fato de que cada amostra de esgoto apresenta um perfil de nutrientes, metais pesados e características físico-químicas únicas.

É possível encontrar variações sazonais no perfil de esgoto proveniente de uma mesma ETE, devido aos hábitos de consumo humano em diferentes épocas do ano. No verão, época de maiores volumes de chuvas e com aumento do consumo de água, é possível encontrar um efluente mais diluído (TERNES, 1998). Foi encontrada também uma maior concentração de lipídeos no esgoto doméstico no período de inverno, no qual os padrões de alimentação, exposição ao sol, atividade física e temperatura são diferentes, resultando em maior

concentração de lipídeos nos excrementos humanos, coletados pelos sistemas de esgoto doméstico (YU; WU; CHANG, 2013).

### 6.1 Parâmetros ambientais

A microalga *Chlorella sorokiniana* apresenta amplo intervalo de temperatura para crescimento, de 23 °C a 40 °C (LIZZUL *et al.*, 2018).

O crescimento e conseqüentemente as remoções máximas de nutrientes dentro do fotobiorreator é dependente do processo de fotossíntese em um sistema majoritariamente fotoautotrófico. Além da intensidade luminosa, é importante também a zona de comprimento de luz presente. A concentração final de biomassa, além de compostos de interesse está diretamente relacionada ao comprimento de onda utilizado, visto que a energia é absorvida pelos pigmentos na zona de menor excitação do mesmo (KHALILI *et al.*, 2015).

A intensidade luminosa dos experimentos variou de 2.488 LUX – menor intensidade luminosa tratamento MJ no Experimento 3 – a 10.878 LUX no tratamento B+C do Experimento 4. As melhores condições de crescimento e remoção de nutrientes foram obtidas no tratamento Colorido do Experimento 4, que apresentou intensidade luminosa média de 10.490.

O melhor crescimento de *Chlorella sorokiniana* foi encontrado na intensidade de 7.500 LUX, seguido de 10.000 LUX, esse dado corrobora com o padrão apresentado nos experimentos (CHIA *et al.*, 2018).

Esse dado é influenciado também pelo caminho óptico da luz. Por estar sendo cultivada em meio turvo, a luminosidade real é menor do que a relatada pelo aparelho. A diminuição do caminho óptico dentro do recipiente ainda é acentuada com o aumento da concentração celular, resultando no recebimento intermitente de luz pelas células. Culturas com baixo caminho óptico, interno ao frasco, se beneficiam de ambientes com altas luminosidades, devido a maior frequência do período Claro-Escuro causado pelo auto sombreamento (MASOJDDEK; TORZILLO; KOBOLDZEK, 2013).

A absorção de energia por organismos fotossintéticos é dependente da natureza química dos pigmentos que a constituem, a maioria dos pigmentos responsáveis pelos processos metabólicos das microalgas são as clorofilas, ficobilinas e os carotenoides (CARVALHO *et al.*, 2011). Esses compostos absorvem energia principalmente nos comprimentos de luz azul (450 – 495 nanômetros) e vermelho (620 – 750 nanômetros) (MATTHIJS *et al.*, 1996). A faixa de luz branca apresenta todos os comprimentos de onda, porém a intensidade de luz azul é abaixo

do nível ótimo para crescimento microalgal (KHALILI *et al.*, 2015). A faixa azul não tem função energética, mas sim de regulação de processos enzimáticos e na regulação do metabolismo de carbono (MATTHIJS *et al.*, 1996).

O complexo de intensidade luminosa e bandas de comprimento luminoso apresentado nos experimentos corroboram com a literatura, nos quais os melhores parâmetros foram obtidos em tratamento com alta luminosidade 10.490 LUX e LED misto de cores vermelha, azul e branca. Dessa forma, todas as necessidades luminosas e de temperatura foram atingidas para bom funcionamento do sistema.

Apesar dos tratamentos B+C e Colorido do Experimento 4 apresentarem pouca diferença entre as médias de LUX ( $\pm 10.730$  e  $\pm 10.210$ , respectivamente) a diferença das medidas em PAR (Radiação Fotossinteticamente ativa) que é a porção do espectro luminoso absorvida pelos pigmentos fotossintéticos das microalgas é maior – verificar tabela 3 -, causando provável fotoinibição no tratamento B+C.

## 6.2 Parâmetros produtivos

A concentração celular máxima obtida nos experimentos variou de  $2,10 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> a  $4,95 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> (Tratamento MJ e Colorido respectivamente). Os resultados de concentração máxima são similares ao encontrado na literatura com utilização de *Chlorella sp.* no tratamento de efluente proveniente de indústria de couro que atingiu a marca de  $4,10 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> (BOBADILLA *et al.*, 2021) e concentração celular máxima de  $1,92 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> de *Chlorella vulgaris* em esgoto doméstico sem adição de carbono (BLANCO *et al.*, 2022). Porém em tratamento de efluentes com suplementação de carbono orgânico e injeção de CO<sub>2</sub> foi encontrada concentração máxima de  $3,15 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup> para *Chlorella sorokiniana* (ESCAPA *et al.*, 2015).

A concentração final de biomassa seca variou de 157 mg L<sup>-1</sup> (Tratamento Branco Experimento 4) a 325 mg L<sup>-1</sup> (Tratamento Colorido Experimento 4). O resultado é menor do que o encontrado na literatura de 1.050 mg L<sup>-1</sup> para *Chlorella sp.* em bateladas alimentadas de 21 dias, 1.054 mg L<sup>-1</sup> de *Chlorella sorokiniana* em efluente secundário em 8 dias para bateladas alimentadas (TERNES, 1998) (CHIA *et al.*, 2018). Concentração final máxima de 1.830 mg L<sup>-1</sup> de *Chlorella sorokiniana* em esgoto, com adição de carbono ainda é relatada (ESCAPA *et al.*, 2015).

Resultados que corroboram com os encontrados nos ensaios realizados também podem ser encontrados, como concentração final de  $220 \text{ mgL}^{-1}$  de *Chlorella sorokiniana* em efluente sem suplementação de carbono orgânico ou  $\text{CO}_2$  (YU; WU; CHANG, 2013).

Após tratamento secundário é comum que a relação C/N do efluente esteja abaixo do ideal segundo a regra de ouro – *Redfield* - para cultivo de microalgas 106:16:1 C:N:P (KWON; OH; YANG, 2013), fazendo com que processos de que sejam dependentes de carbono sejam prejudicados (RYU; KANG; LEE, 2009) (SU, 2021). O Carbono é nutriente essencial para o processo de fotossíntese das microalgas, podendo ser utilizado na forma inorgânica  $\text{CO}_2$  para produção de biomassa de forma fotoautotrófica ou na forma orgânica (Açúcares, álcoois e ácidos) por meio de processos heterotróficos. Dessa forma a limitação de carbono no meio é diretamente ligado a baixa produtividade do sistema (SU, 2021).

Outro fator em comum com todos os experimentos referenciados acima é a duração da batelada, tendo todos sido realizados entre 14 e 21 dias. Apesar de rapidamente esgotar os nutrientes, as microalgas têm a capacidade de “remoção de luxo”, ou seja, retirar e estocar para posteriormente usar, podendo atingir produções até 50 % maiores após a depleção total dos nutrientes (MCGINN *et al.*, 2012). Posto isto, é possível que mesmo após o início da fase estacionária – em relação a duplicação de células – nos experimentos 3 e 7 ocorresse aumento na biomassa total, devido ao crescimento unitário das células. Interrompido pelo final das bateladas de 7 dias (FIGURAS 12, 15 E 18).

A Velocidade específica de crescimento obtido nos experimentos condiz com as informações presentes na literatura atual, com uma fase LOG de 4 a 6 dias (LI *et al.*, 2011). O gênero *Chlorella sp.* apresenta uma alta Velocidade específica de crescimento e baixo tempo de duplicação devido à grande capacidade de conversão de energia em crescimento (MOHAMMADI *et al.*, 2018).

As remoções máximas do presente estudo são condizentes com a literatura quando se trata de efluentes de esgoto após tratamento secundário, variando de 77 % a 93 % da remoção total de fósforo e 67 % a 85 % da remoção total de nitrogênio (DAS *et al.*, 2019) (ASADI; RAD; QADERI, 2019) (MOHAMMADI *et al.*, 2018) (MCGINN *et al.*, 2012) (DELGADILLO-MIRQUEZ *et al.*, 2016) (CHOI; LEE, 2015).

O nitrogênio apresenta papel chave na sintetização de aminoácidos, ácidos nucleicos e pigmentos (KWON; OH; YANG, 2013). A forma preferencial de absorção do nitrogênio é na forma de  $\text{NH}_4^+$  devido ao baixo custo energético da reação, mas também pode assimilar nas

formas de nitrito e nitrato (CHOI; LEE, 2015). O fósforo é necessário para diversas atividades metabólicas, produção de lipídeos, transferência de energia e síntese de DNA (KWON; OH; YANG, 2013).

As relações N/P encontradas no presente estudo foram baixas, variando de 1,25 a 2,65. A relação ideal entre N/P tanto para produção de biomassa, como para remoção de nutrientes varia entre 5 e 30, sendo otimizada entre 11 e 20 (CHOI; LEE, 2015). Baixas proporções entre N/P geram acúmulo de lipídeos, como o triacilglicerol (TAG), componente utilizável para a produção de biodiesel e outros biocombustíveis, demonstrando que a utilização de microalgas em esgoto doméstico secundário é uma possível fonte para produção de bioenergia apesar da baixa produtividade encontrada (MCGINN *et al.*, 2012) (HU *et al.*, 2008). Baixas proporções entre as concentrações de N/P priorizam a remoção de nitrogênio total do sistema (DAS *et al.*, 2019) (DELGADILLO-MIRQUEZ *et al.*, 2016) (CHOI; LEE, 2015). Porém nos experimentos realizados essa relação não foi verdadeira, no qual se encontrou maior remoção de fósforo total, como é possível perceber nas figuras 10, 11, 14, 17, 21, 22, 25, 30 e 31.

A fotossíntese e consequente remoção de CO<sub>2</sub> do sistema, causa aumento de pH e é um indicador de atividade de microalgas durante a fase clara, nos experimentos 3 e 4, por não serem suplementado com CO<sub>2</sub> ou outra fonte de carbono ácida, é possível que o pH do sistema tenha subido (ca. 9) e causado perdas abióticas desses nutrientes. A perda do Nitrogênio de forma abiótica acontece por meio da elevação do pH e redução dos íons de H<sup>+</sup> para equilíbrio químico. Dessa forma o nitrogênio em sua forma gasosa é expelido do sistema pela aeração. O fenômeno é conhecido como *air stripping* (DELDUQUE *et al.*, 2017).

Já a perda abiótica do Fósforo é causada pela precipitação na forma de sal. Ao aumentar o pH o fosfato tende a se misturar com o cálcio e o magnésio para formar fosfato de cálcio [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] e fosfato de magnésio ([Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] e precipitar. Foi encontrada correlação entre aumento do pH e remoção de fosfato com R<sup>2</sup> 0,9712 em sistema tradicional de tratamento de esgoto (YI; LO, 2003).

As perdas abióticas nos experimentos 3 e 4 tem caráter hipotético, pois nesses experimentos não foi realizado aferimento de pH. Já no experimento 5, no qual houve acompanhamento do pH é entendível que as perdas abióticas de fósforo e nitrogênio foram baixas.

O experimento 5 apresentou baixa variação de pH, cultivos mixotróficos apresentam menor variação de pH devido a utilização do CO<sub>2</sub> através de vias metabólicas autotróficas que

são compensadas pela liberação de CO<sub>2</sub> através de vias metabólicas heterotróficas dos microrganismos ali presentes (LI *et al.*, 2012). O esgoto doméstico tratado é rico tanto em carbono orgânico e inorgânico, como apresentado nos resultados do experimento 5. Além disso, ao utilizar o esgoto tratado sem processos de esterilização como meio de cultura, são encontrados microrganismos da microbiota nativa que tem preferência por processos heterotróficos.

Para crescimento das microalgas no experimento 5, com suplementação de CO<sub>2</sub> por meio de aeração, com taxa de 5 % do volume total, não foi encontrada diferença significativa nos resultados de concentração celular ou biomassa produzida. Os resultados divergem do encontrado na bibliografia (NEVES, 2013) (ESCAPA *et al.*, 2015) (NAYAK; KAREMORE; SEN, 2016) (COSTA; COLLA; DUARTE, 2004) (ZIGANSHINA *et al.*, 2020).

Estudos demonstram maior concentração celular de cultivos de *Chlorella sorokiniana* com suplementação de 0,5 % a 2 % de CO<sub>2</sub>, atingindo 1,2-1,4 x 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup> com suplementação contra 6 x 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup> no tratamento sem suplementação de CO<sub>2</sub> (NAYAK; KAREMORE; SEN, 2016). Porém, alguns estudos também demonstram que não foi encontrada diferença na concentração final de biomassa seca em cultivos de microalga suplementados com 5 % de CO<sub>2</sub>, em relação aos não suplementados (NEVES, 2013).

Estudos demonstram que a baixa suplementação de CO<sub>2</sub> pode trazer resultados positivos como a maior produtividade de biomassa, adiantamento da fase LOG no cultivo, melhores índices produtivos como maior taxa de Velocidade específica de crescimento e menor tempo de duplicação, além de aumentar a remoção de nutrientes. Porém esses estudos também demonstram que uma suplementação acima do necessário pode causar diminuição dos mesmos parâmetros aqui citados (NEVES, 2013) (COSTA; COLLA; DUARTE, 2004) (ZIGANSHINA *et al.*, 2020). A utilização de materiais de baixa precisão na adaptação do sistema de suplementação de CO<sub>2</sub> pode ter afetado a suplementação de CO<sub>2</sub> no Experimento 5, fazendo com que os resultados esperados fossem distorcidos através de uma suplementação de CO<sub>2</sub> acima do desejado.

Como demonstrado na figura 26 e 32, a partir do dia 7 existe uma diminuição considerável da concentração celular, como também da massa seca no dia 10 e na remoção máxima de carbono inorgânico. Ao atingir uma alta concentração celular, começam a ocorrer os efeitos do auto sombreamento e da formação de biofilme, reduzindo a quantidade de luz – energia – que atinge as células, prejudicando a biofixação do CO<sub>2</sub> (AL-GHEETHI *et al.*, 2017). Além dos

efeitos da depleção quase total dos nutrientes e entrada na fase de mortalidade. O que pode explicar o aumento da concentração de carbono total e inorgânico no sistema a partir deste momento.

Esgoto tratado doméstico pode apresentar uma grande gama de microrganismos, como coliformes e *E. coli*, que contribuem para a disseminação de doenças. O experimento 5 atingiu remoção de cerca de 99 % de *E. coli* para ambos os tratamentos. Os resultados corroboram com os resultados encontrados na literatura (CHAI *et al.*, 2021) (MEZRIQUI *et al.*, 1994)(SHAIMA *et al.*, 2022). A remoção desse patógeno é principalmente devido a produção de formas tóxicas de oxigênio e ao aumento do pH (CHAI *et al.*, 2021) (SHAIMA *et al.*, 2022). A liberação de O<sub>2</sub> no processo fotossintético, juntamente com a alta luminosidade causam danos foto-oxidativos as células dos patógenos, resultando na eliminação do mesmo. A alta iluminação pode causar também dano a estrutura de DNA, destruindo as organelas da bactéria (CHAI *et al.*, 2021) (MEZRIQUI *et al.*, 1994).

Outro mecanismo de remoção de patógenos é a excreção de metabólitos inibitórios pelas microalgas, que buscam competir por nutrientes com as bactérias. Foi encontrada alta remoção de *Vibrio cholerae* devido a secreção de compostos tóxicos pela microalga do gênero *Chlorella sp.* (SHAIMA *et al.*, 2022).

## 7 Conclusões

O fotobiorreator ainda em fase experimental se demonstra promissor no tratamento de efluentes para remoção de nutrientes, porém ainda apresenta baixa concentração final de biomassa de *Chlorella sorokiniana* quando comparado com a literatura.

As modificações luminosas propostas e realizadas tornaram o ambiente interno do fotobiorreator homogêneo e aumentaram a concentração final de biomassa de *Chlorella sorokiniana* em 36 % quando comparado com o melhor resultado pré modificações.

A escolha do efluente é de extrema importância para funcionamento do fotobiorreator, visto que as características do efluente podem ser diferentes de uma fonte a outra ou até mesmo da mesma fonte em momentos diversos. Podendo conter contaminantes ou concentrações inibitórias para o crescimento das microalgas. O esgoto proveniente da ETE Monjolinho da cidade de São Carlos – SP se provou o mais adequado para produção de *Chlorella sorokiniana* no fotobiorreator.

O fotobiorreator se mostrou eficiente na remoção de nutrientes, removendo 85 % do nitrogênio total e 90 % do fósforo total no esgoto proveniente da ETE Monjolinho, tornando o efluente elegível para descarte em corpos de água segundo a legislação brasileira.

O cultivo de microalgas foi capaz de remover 99 % das Unidades Formadoras de Colônias da bactéria *E. coli* independentemente do tratamento, encontrada nos esgotos domésticos.

A suplementação de 5 % (V/V) de CO<sub>2</sub> não apresentou melhora nos parâmetros produtivos do fotobiorreator, nem nos índices de remoção de nutrientes.

## **8 Perspectivas para o futuro**

Modificações ainda são necessárias para que o produto se torne comercialmente viável, como o aumento da capacidade total, aumento da concentração final de biomassa, desenvolvimento de método correto de descarte pós batelada e automatização do processo.

Alguns estudos ainda devem ser executados para que o protótipo seja lançado no mercado, como testes de utilização do efluente ou da biomassa após a execução da batelada, teste com diferentes condições ambientais, para aumento da produção de compostos de interesse e maior produção de biomassa, teste de bateladas alimentadas e o uso de efluente sintético ou meio de cultura sintético para produção maximizada de microalgas para fins laboratoriais ou de consumo direto humano.

## 9 Referencias

- 1 JHANSI, Seetharam Chittoor; MISHRA, Santosh Kumar. Wastewater treatment and reuse: sustainability options. **Consilience**, n. 10, p. 1-15, 2013.
- 2 SUN, Yan *et al.* Characteristics of water quality of municipal wastewater treatment plants in China: implications for resources utilization and management. **Journal of Cleaner Production**, v. 131, p. 1-9, 2016.
- 3 KUMAR, Ramesh; PAL, Parimal. Assessing the feasibility of N and P recovery by struvite precipitation from nutrient-rich wastewater: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 17453-17464, 2015.
- 4 RÜHLAND, Kathleen; PATERSON, Andrew M.; SMOL, John P. Hemispheric-scale patterns of climate-related shifts in planktonic diatoms from North American and European lakes. **Global Change Biology**, v. 14, n. 11, p. 2740-2754, 2008.
- 5 SUKAČOVÁ, Kateřina; TRTÍLEK, Martin; RATAJ, Tomáš. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. **Water research**, v. 71, p. 55-63, 2015.
- 6 KWON, Hyeong Kyu; OH, Seok Jin; YANG, Han-Soeb. Growth and uptake kinetics of nitrate and phosphate by benthic microalgae for phytoremediation of eutrophic coastal sediments. **Bioresource technology**, v. 129, p. 387-395, 2013.
- 7 RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: applied phycology and biotechnology**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2013. 726 p.
- 8 FALKOWSKI, Paul G.; KNOLL, Andrew H. An introduction to primary producers in the sea: who they are, what they do, and when they evolved. In: **Evolution of primary producers in the sea**. Academic Press, 2007. p. 1-6.
- 9 MASOJĎDEK, Jiří; TORZILLO, Giuseppe; KOBĎŤZEK, Michal. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: applied phycology and biotechnology**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2013. Cap. 2. p. 21-36.
- 10 MORIMURA, Yuji. Synchronous culture of *Chlorella*: I. Kinetic analysis of the life cycle of *Chlorella ellipsoidea* as affected by changes of temperature and light intensity. **Plant and cell physiology**, v. 1, n. 1, p. 49-62, 1959.

- 11 LIU, Jin; HU, Qiang. Chlorella: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals. In: RICHMOND, Amos. **Handbook of Microalgal Culture: applied phycology and biotechnology**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2013. Cap. 16. p. 329-338.
- 12 NEVES, Fábio de Farias. FIXAÇÃO DE CARBONO ATRAVÉS DE MICROALGAS NATIVAS (*Chlamydomonas* sp.) CULTIVADAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CO<sub>2</sub>. 2013. 200 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- 13 LEGRAND, Jack; ARTU, Arnaud; PRUVOST, Jérémy. A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. **Reaction Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 1134-1151, 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d0re00450b>.
- 14 FAO. Algae-Based Biofuels - A Review of Challenges and Opportunities for Developing Countries. Roma, Italy. 2009.
- 15 ZHOU, Wenguang; LU, Qian; HAN, Pei; LI, Jingjing. Microalgae Cultivation and Photobioreactor Design. **Microalgae Cultivation For Biofuels Production**, [S.L.], p. 31-50, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-817536-1.00003-5>.
- 16 SIROHI, Ranjna; PANDEY, Ashutosh Kumar; RANGANATHAN, Panneerselvam; SINGH, Shikhangi; UDAYAN, Aswathy; AWASTHI, Mukesh Kumar; HOANG, Anh Tuan; CHILAKAMARRY, Chaitanya Reddy; KIM, Sang Hyoun; SIM, Sang Jun. Design and applications of photobioreactors- a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 349, p. 126858, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126858>.
- 17 CLESCERI, Lenore S. Standard methods for examination of water and wastewater. American public health association, v. 9, 1998.
- 18 KHOR, Wei Han; KANG, Hooi-Siang; LIM, Jun-Wei; IWAMOTO, Koji; TANG, Collin Howe-Hing; GOH, Pei Sean; QUEN, Lee Kee; SHAHARUDDIN, Nik Mohd Ridzuan Bin; LAI, Nai Yeen Gavin. Microalgae cultivation in offshore floating photobioreactor: state-of-the-art, opportunities and challenges. **Aquacultural Engineering**, [S.L.], v. 98, p. 102269, ago. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2022.102269>.
- 19 AUGUSTOS DE LEMOS CHERNICHARO, Carlos; VON SPERLING, Marcos. **Biological wastewater treatment in warm climate regions**. IWA publishing, 2005.

- 20 DAS, P. *et al.* Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. **International journal of environmental science and technology**, v. 16, p. 3355-3364, 2019.
- 21 CHAI, Wai Siong *et al.* Multifaceted roles of microalgae in the application of wastewater biotreatment: a review. **Environmental Pollution**, v. 269, p. 116236, 2021.
- 22 QUIJANO, Guillermo; ARCILA, Juan S.; BUITRÓN, Germán. Microalgal-bacterial aggregates: applications and perspectives for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 772-781, 2017.
- 23 ACIÉN FERNÁNDEZ, Francisco Gabriel; GÓMEZ-SERRANO, Cintia; FERNÁNDEZ-SEVILLA, José María. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, p. 59, 2018.
- 24 WOLLMANN, Felix *et al.* Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 12, p. 860-871, 2019.
- 25 MOHSENPOUR, Seyedeh Fatemeh *et al.* Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 142168, 2021.
- 26 CALLEGARI, Arianna *et al.* Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: a state-of-the-art review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 4, p. 384-436, 2020.
- 27 LI, Shengnan; LI, Xue; HO, Shih-Hsin. Microalgae as a solution of third world energy crisis for biofuels production from wastewater toward carbon neutrality: an updated review. **Chemosphere**, [S.L.], v. 291, p. 132863, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132863>.
- 28 OSUNDEKO, Olumayowa *et al.* Acclimation of microalgae to wastewater environments involves increased oxidative stress tolerance activity. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 10, p. 1848-1857, 2014.
- 29 CHIA, Shir Reen *et al.* Analysis of economic and environmental aspects of microalgae biorefinery for biofuels production: a review. **Biotechnology journal**, v. 13, n. 6, p. 1700618, 2018.
- 30 DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício; CARVALHO, Sabrina Matos de; FETT, Roseane. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 1959-1967, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782006000600050>.

- 31 EATON, Andrew D. *et al.* **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. 21. ed. Eua: Amer Public Health Assn, 2005.
- 32 OLIVEIRA, Gabriela Laia de. **Processo de tratamento biológico e físico-químico combinados visando o reúso de esgoto sanitário**. 2012. 157 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Hidráulica e Sanitária, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 33 DEXTRO, Rafael Barty. Efeitos do cobre na microalga *Kirchneriella obesa* em cultura unialgal e em co-cultivo com *Chlorella sorokiniana*. 2019.
- 34 PINTO, Ernani *et al.* Heavy metal-induced oxidative stress in algae 1. **Journal of phycology**, v. 39, n. 6, p. 1008-1018, 2003.
- 35 TERNES, Thomas A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water research**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, 1998.
- 36 YU, Yong; WU, Laosheng; CHANG, Andrew C. Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 442, p. 310-316, 2013.
- 37 LIZZUL, Alessandro Marco *et al.* Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. **Biology**, v. 7, n. 2, p. 25, 2018.
- 38 KHALILI, Arezoo *et al.* Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 20, p. 284-290, 2015.
- 39 ASADI, Pariya; RAD, Hassan Amini; QADERI, Farhad. Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* pa. 91 in post treatment of dairy wastewater treatment plant effluents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 29473-29489, 2019.
- 40 CARVALHO, Ana P. *et al.* Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, p. 1275-1288, 2011.
- 41 MATTHIJS, Hans CP *et al.* Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). **Biotechnology and bioengineering**, v. 50, n. 1, p. 98-107, 1996.
- 42 BOBADILLA, Jorge Luis Mendoza *et al.* Growth evaluation of the microalgae *Chlorella* sp. with tannery effluent from the soaking stage [Evaluación del crecimiento de la

- microalga *Chlorella* sp. con efluente de curtiembre de la etapa de remojo]. **Journal of Energy & Environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 29-36, 2021.
- 43 BLANCO, Gabriel Costa *et al.* Sustainable integration of biofuel generation and domestic wastewater treatment by *Chlorella vulgaris*: Integração sustentável da geração de biocombustíveis e do tratamento de águas residuais domésticas pela *Chlorella vulgaris*. **Brazilian Journal of Development**, p. 55537-55554, 2022.
- 44 ESCAPA, C. *et al.* Nutrients and pharmaceuticals removal from wastewater by culture and harvesting of *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 276-284, 2015.
- 45 MOHAMMADI, Masoumeh *et al.* Cultivation of microalgae in a power plant wastewater for sulfate removal and biomass production: A batch study. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2812-2820, 2018.
- 46 RAMANNA, Luveshan *et al.* The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. **Bioresource technology**, v. 168, p. 127-135, 2014.
- 47 POSADAS, E.; ALCÁNTARA, C.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; GOUVEIA, L.; GUIEYSSE, B.; NORVILL, Z.; ACIÉN, F.G.; MARKOU, G.; CONGESTRI, R.; KOREIVIENE, J.. Microalgae cultivation in wastewater. **Microalgae-Based Biofuels And Bioproducts**, [S.L.], p. 67-91, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-101023-5.00003-0>.
- 48 RYU, Hong-Duck; KANG, Joo-Hyoung; LEE, Sang-Il. Evaluation of a three-stage biological aerated filter system combined recirculation/dynamic flow in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater. **Environmental engineering science**, v. 26, n. 8, p. 1349-1357, 2009.
- 49 POSADAS, E.; BOCHON, S.; COCA, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C.; GARCÍA-ENCINA, P.A.; MUÑOZ, R.. Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening of biodegradability. **Journal Of Applied Phycology**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 2335-2345, 12 fev. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0263-0>.
- 50 SU, Yanyan. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 762, p. 144590, 2021.

- 51 MCGINN, Patrick J. *et al.* Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, v. 1, n. 2, p. 155-165, 2012.
- 52 LI, Yecong *et al.* Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource technology**, v. 102, n. 8, p. 5138-5144, 2011.
- 53 DELGADILLO-MIRQUEZ, Liliana *et al.* Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. **Biotechnology reports**, v. 11, p. 18-26, 2016.
- 54 JIA, Huijun; YUAN, Qiuyan. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1275089, 31 dez. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/23311843.2016.1275089>.
- 55 CHOI, Hee Jeong; LEE, Seung Mok. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, p. 761-766, 2015.
- 56 HU, Qiang *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant journal**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.
- 57 DELDUQUE, Thalita Pereira *et al.* **Remoção da amônia por air stripping em canais corrugados helicoidais**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- 58 YI, Wei-Gang; LO, Kwang Victor. Phosphate recovery from greenhouse wastewater. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 38, n. 4, p. 501-509, 2003.
- 59 LI, Yecong *et al.* Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. **Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], v. 109, n. 9, p. 2222-2229, 22 mar. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24491>.
- 60 NAYAK, Manoranjan; KAREMORE, Ankush; SEN, Ramkrishna. Sustainable valorization of flue gas CO<sub>2</sub> and wastewater for the production of microalgal biomass as a biofuel

- feedstock in closed and open reactor systems. **Rsc Adv.**, [S.L.], v. 6, n. 94, p. 91111-91120, 2016. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c6ra17899e>.
- 61 COSTA, J.A.V., COLLA, L.M., DUARTE, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield a fed-batch process. **Bioresource Technology**. v. 92, p. 237–241, 2004.
- 62 AL-GHEETHI, A. A.; MOHAMED, R. M.; JAIS, N. M.; EFAQ, A. N.; HALID, Abdullah Abd; WUROCHEKKE, A. A.; AMIR-HASHIM, M. K.. Influence of pathogenic bacterial activity on growth of *Scenedesmus* sp. and removal of nutrients from public market wastewater. **Journal Of Water And Health**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 741-756, 13 jul. 2017. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2017.080>.
- 63 MEZRIOUI, N.; OUDRA, B.; OUFDOU, K.; HASSANI, L.; LOUDIKI, M.; DARLEY, J.. Effect of microalgae growing on wastewater batch culture on *escherichia coli* and *vibrio cholerae* survival. **Water Science And Technology**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 295-302, 1 out. 1994. IWA Publishing. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.1994.0428>.
- 64 SHAIMA, Abdul Fattah; YASIN, Nazlina Haiza Mohd; IBRAHIM, Nazlina; TAKRIFF, Mohd Sobri; GUNASEKARAN, Darvien; ISMAEEL, Mahmud Y.y.. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9). **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 1043-1052, fev. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.069>.