

JÉSSICA FERREIRA

SISTEMA DE CULTIVO ADERIDO DE MICROALGAS: ESTUDO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME E PERÍODOS DE COLHEITA NO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO E NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria Lúcia Calijuri

Coorientadora: Paula Peixoto Assemany

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

F383s
2022 Ferreira, Jéssica, 1995-
Sistema de cultivo aderido de microalgas: estudo da formação do biofilme e períodos de colheita no tratamento de esgoto doméstico e na obtenção de bioprodutos / Jéssica Ferreira. - Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (138 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Civil, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.417>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Algas - Cultura e meios de cultura; 2. Biofilmes; 3. Biomassa; 4. Carotenoides; 5. Nitrogênio; I. Calijuri, Maria Lúcia II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil III. Título

CDD 22. ed. 579.8

Bibliotecário(a) responsável: EUZEBIO LUIZ PINTO CRB-6/3317

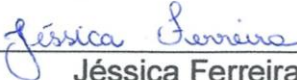
JÉSSICA FERREIRA

SISTEMA DE CULTIVO ADERIDO DE MICROALGAS: ESTUDO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME E PERÍODOS DE COLHEITA NO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO E NA OBTENÇÃO E BIOPRODUTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de fevereiro de 2022.

Assentimento:


Jéssica Ferreira

Autora


Maria Lúcia Calijuri
Orientadora

*À Deus.
Aos meus pais José Roberto e
Jacquesmara.
À minha irmã Ana Caroline.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter preparado toda essa trajetória que vivi, antes mesmo que eu sonhasse vive-la, e por me dar saúde, sabedoria e fé para finalizar essa pesquisa. Com muito me abençoou! Que toda honra e glória seja dada a Ele.

Aos meus pais, Jacquesmara e José Roberto, pela compreensão da distância, por sempre incentivarem meus estudos e pelo apoio e amor incondicional. Não existe minhas conquistas, mas sim nossas!

À minha irmã, Ana Caroline, e minha prima, Sabrina, por todo apoio, torcida e por acreditarem em mim.

As minhas avós, tias, tios, primos e primas pela compreensão pela distância e por todo o amor que me dedicam e que me fortalece.

À Universidade Federal de Viçosa pelas oportunidades de ensino e amadurecimento.

À professora Lúcia Calijuri por confiar a mim a execução deste trabalho e oferecer todo o suporte para sua conclusão. Obrigada pelo exemplo de dedicação a pesquisa e por todos os conselhos, que levo comigo na vida profissional e pessoal.

À professora Paula Assemany e a pós-doutoranda Letícia Assis pela orientação minuciosa e dedicada, que foi essencial para a realização desta pesquisa. Agradeço por todo aprendizado, carinho, amizade e por viverem ao meu lado umas das minhas maiores realizações.

Ao Alberto Reis pelas contribuições valiosas para esta pesquisa e aceite em participar da banca de defesa.

À professora Maria do Carmo Calijuri pelas contribuições valiosas para esta pesquisa e aceite em participar da banca de defesa.

Ao professor Eduardo Couto pelas contribuições valiosas para esta pesquisa e aceite em participar da banca de defesa.

À Marília, Miriam, Weller e Lara pela dedicação e ajuda na coleta de dados e monitoramento dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao órgão de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos órgãos de fomento CNPq Universal (420429/2018-2) e Fapemig Universal (APQ-02527-18) pelos recursos destinados à realização desta pesquisa.

A todos do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA/UFV), em especial à Priscila pelo apoio nas atividades experimentais.

Ao professor André Cordeiro Alves dos Santos pela ajuda nas análises de caracterização da comunidade de microalgas.

Ao Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE) de Viçosa – MG pela parceria, em especial ao Edson.

Aos colegas do SIGEOnPA pelo convívio e aprendizado diário. Em especial à Jackeline Castro, a quem muito admiro, por todo o aprendizado, e ao Thiago, Alexia, Iann, Adriana, Rafael, Matheus e Lara pela amizade, carinho e apoio ao longo desses anos.

Ao Ian por todo amor, cuidado e por estar ao meu lado em todos os momentos.

*“Porque dEle e Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória
pois a ele eternamente. Amém”.*
(Romanos 11:36)

RESUMO

FERREIRA, Jéssica, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Sistema de cultivo aderido de microalgas: estudo da formação do biofilme e períodos de colheita no tratamento de esgoto doméstico e na obtenção de bioprodutos.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri. Coorientadora: Paula Peixoto Assemany.

Os sistemas de cultivo baseados em biofilme vêm sendo apontados como tecnologias inovadoras para produção de biomassa de microalgas. O cultivo aderido permite superar gargalos do cultivo suspenso, especialmente, na etapa de colheita, que se torna mais simples, barata e mais eficiente para recuperar a biomassa. Os avanços já relatados para esses sistemas são voltados para fatores que afetam a formação do biofilme, desenvolvimento de diferentes designs de reatores e tipos de materiais suportes, bem como demonstram os seus desempenhos para produção e colheita de biomassa. Acredita-se que a compreensão da recuperação de recursos pelo biofilme e o período de colheita possam ser mais bem explorados. O presente estudo revisou os mais atuais avanços técnicos, econômicos e ambientais dos reatores de biofilme, assim como avaliou o potencial de recuperação de nitrogênio e carotenoides totais por meio do biofilme, investigando suas produtividades em diferentes períodos de colheita. Para o nitrogênio, foram realizados um monitoramento de seu teor ao longo da formação do biofilme e um balanço de massa. O teor de nitrogênio não apresentou grandes variações, no período avaliado, e se manteve, em média, em 61,1 mg g biofilme⁻¹, sendo recuperado 4,2% do nitrogênio afluente ao sistema. Esses resultados foram associados a estabilidade na abundância de espécies de microalgas nesse período, no qual a *Chlorella vulgaris* apresentou abundância acima de 72%. A produtividade de biomassa e carotenoides foram avaliadas considerando três períodos de raspagem do biofilme: 12, 18 e 24 dias. Maiores produtividades de sólidos voláteis e clorofila-a foram observadas em maiores períodos de colheita. Por outro lado, o biofilme colhido em 12 dias apresentou produtividade significativamente maior de carotenoides totais. O estudo foi realizado sobre condições ambientais e utilizando esgoto doméstico real (após tratamento primário em tanque séptico). Dessa forma, seus resultados refletem desafios que podem ser encontrados no tratamento de águas residuárias em escala real. Acredita-se que os resultados encontrados representam

uma fonte de orientação para estudos futuros quanto a estratégias de operação e aproveitamento de biomassa colhida.

Palavras-chave: Biofilme microalgal. Águas residuárias. Recuperação de nitrogênio. Período de colheita. Carotenoides.

ABSTRACT

FERREIRA, Jéssica, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Microalgae attached cultivation system: study of biofilm formation and harvest period in the domestic sewage treatment and obtaining bioproducts.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri. Co-adviser: Paula Peixoto Assemany.

Biofilm-based cultivation systems have been identified as innovative technologies for the production of microalgae biomass. Attached cultivation makes it possible to overcome the bottlenecks of suspended cultivation, especially in the harvesting stage, which becomes simpler, cheaper and more efficient for biomass recovery. The advances already reported for these systems are focused on factors that affect biofilm formation, development of different reactor designs and types of support material, as well as demonstrating their performance for biomass production and harvesting. Therefore, the understanding of resources recovery by the biofilm and the harvest period can be better explored. The present study reviewed the most current technical, economic and environmental advances of biofilm reactors, as well as evaluated the potential for nitrogen and carotenoids recoveries through the biofilm, investigating their productivity in different cultivation periods. For nitrogen, a monitoring of its content throughout the biofilm formation and a mass balance were performed. The nitrogen content did not show great variations in the evaluated period, and remained, on average, $61.1 \text{ mg g biofilm}^{-1}$, with only 4.2% of the nitrogen that entered the system being recovered. These results were associated with the stability in the abundance of microalgae species in this period, in which *Chlorella vulgaris* presented abundance above 72%. Biomass and carotenoid productivities were evaluated considering three harvest periods: 12, 18 and 24 days. Higher productivities of volatile solids and chlorophyll-a were observed at higher harvest periods. On the other hand, the biofilm harvested in 12 days showed significantly higher productivity of carotenoids. The study was carried out under environmental conditions and using real domestic sewage (after primary treatment in a septic tank). In this way, it reflected challenges that can be encountered in the treatment of wastewater on a large scale. It is believed that the results found here can guide future studies regarding operating strategies and the use of harvested biomass.

Keywords: Microalgal biofilm. Wastewater. Nitrogen recovery. Harvest periods. Carotenoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Etapas da formação do biofilme	28
Figura 5.2 - Espécies reportadas em biofilmes cultivados em diferentes (a) meios de cultivo e (b) materiais suporte. O número de vezes em que cada espécie foi citada em diferentes artigos publicados foi considerado	33
Figura 5.3 – Materiais suportes mais citados nas pesquisas de crescimento aderido de microalgas	42
Figura 6.1 – (a) Diagrama esquemático e (b) e (c) imagens dos reatores de biofilme no segundo dia de operação	69
Figura 6.2 – Valores de (a) temperatura, (b) pH, (c) PAR e (d) oxigênio dissolvido do meio de cultivo ao longo da operação (n=3, barras verticais representam o desvio padrão)	77
Figura 6.3 – Monitoramento de (a) sólidos totais voláteis e (b) clorofila-a ao longo da formação do biofilme (n=3, barras verticais representam o desvio padrão)	82
Figura 6.4 – Valores de (a) NTK, (b) N-NH ₄ ⁺ , (c) N-NO ₃ ⁻ , (d) teor (eixo a esquerda) e produção (eixo a direita) de N ao longo da formação do biofilme (n=3, barras verticais representam o desvio padrão)	85
Figura 6.5 – Formas de nitrogênio do esgoto doméstico bruto e tratado no RB	88
Figura 6.6 – (a) Densidade total de organismos e abundâncias de indivíduos no (b) inóculo e biomassa suspensa no final da operação e (c) no biofilme ao longo de sua formação	91
Figura 7.1 – Sistema de cultivo de crescimento aderido	107
Figura 7.2 – Biofilme formado em 12 (tratamento 1), 18 (tratamento 2) e 24 (tratamento 3) de dias de cultivo	116
Figura 7.3 – Rendimento (eixo a esquerda) e produtividade (eixo a direita) de carotenoides por (a) área e (b) STV do biofilme (n = 2, barras verticais representam o desvio padrão)	119
Figura A6.1 – Valores de radiação fotossinteticamente ativa ao longo do experimento	137
Figura A7.1 – Valores de radiação fotossinteticamente ativa ao longo do experimento	137
Figura A7.2 – Variação da radiação fotossinteticamente ativa medida entre 12h e 14h ao longo do experimento descrito no Capítulo III	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 – Caracterização de variáveis de qualidade e eficiência de tratamento do esgoto doméstico	79
Tabela 6.2 – Produtividade de biomassa, remoção e recuperação de N em RBs encontrados na literatura e neste estudo	83
Tabela 6.3 – Caracterização bioquímica da biomassa aderida	94
Tabela 7.1 – Delineamento experimental	109
Tabela 7.2 – Concentrações do esgoto antes e após o tratamento e eficiências de remoção de variáveis de qualidade da água (valores médios, desvio padrão apresentado em parênteses, n =2)	114
Tabela 7.3 – Produção de biomassa (n=2, desvios padrões foram apresentados em parênteses)	117
Tabela 7.4 – Teor de proteínas, carboidratos e cinzas (desvio padrão apresentado entre parênteses)	121
Tabela A5.1 – Variedade de materiais estudados e comparados em pesquisas de crescimento aderido de microalgas	136

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 6.1	71
Equação 6.2	72
Equação 6.3	73
Equação 6.4	74
Equação 6.5	74
Equação 7.1	110
Equação 7.2	111
Equação 7.3	111
Equação 7.4	111

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATS	<i>Algal Turf Scrubber.</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CO ₂	Gás carbônico.
DQOs	Demanda química de oxigênio dissolvido.
ETAR	Estação de tratamento de águas residuárias.
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares.
FBR	Fotobiorreator.
LAT	Lagoa de alta taxa.
LCA	Análise de ciclo de vida.
N	Nitrogênio.
MFSP	Preço mínimo de venda do combustível.
NER	Razão de energia líquida.
N:P	Relação de nitrogênio e fósforo.
N-NH ₄ ⁺	Nitrogênio amoniacal total.
N-NO ₃ ⁻	Nitrato.
NTK	Nitrogênio total <i>Kjeldahl</i> .
OD	Oxigênio dissolvido.
P	Fósforo.
Ps	Fósforo solúvel.
RB	Reator de biofilme.
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa.
STV	Sólidos totais voláteis.
T1	Tratamento 1.
T2	Tratamento 2.
T3	Tratamento 3.
TEA	Análise técnico-econômica.
TDH	Tempo de detenção hidráulica.

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem.
- θ_c Tempo de retenção de sólidos.
- μ Tempo de residência celular.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	18
2. INTRODUÇÃO GERAL	20
3. HIPÓTESES	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo geral	23
4.2. Objetivos específicos	23
5. CAPÍTULO I. REATORES DE BIOFILME COMO INOVAÇÃO PARA PRODUÇÃO E COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS.....	24
5.1. Introdução	24
5.2. Desenvolvimento do biofilme	27
5.3. Consórcio microalgal-bacteriano e suas interações.....	29
5.4. Composição de espécies em biofilmes	30
5.5. Fatores que influenciam na formação do biofilme	35
5.6. Mecanismo de remoção de nutrientes	38
5.7. Reatores de biofilme	39
5.7.1. Configurações dos reatores de biofilme.....	40
5.7.2. Materiais suporte de aderência.....	41
5.7.3. Sistemas híbridos	44
5.8. Avanços na sustentabilidade econômica e ambiental de crescimento aderido	45
5.8.1. Análises econômicas	47
5.8.2. Análises de impacto ambiental	50
5.9. Conclusões	54
5.10. Referências	55
6. CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME MICROALGAL-BACTERIANO APLICADO AO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO: AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO E COMUNIDADE DE MICROALGAS	65
6.1. Introdução	66
6.2. Materiais e Métodos.....	68
6.2.1. <i>Design</i> do reator de biofilme.....	68
6.2.2. Meio de cultivo e inóculo	69
6.2.3. Operação do reator de biofilme	70
6.2.4. Procedimentos analíticos.....	70
6.2.4. Balanço de massa de nitrogênio	73

6.2.5.	Análise estatística.....	75
6.3.	Resultados e discussão	75
6.3.1.	Condições ambientais e tratamento de esgoto doméstico	75
6.3.2.	Crescimento de biomassa suspensa e aderida.....	81
6.3.3.	Taxa de remoção e balanço de massa nitrogênio	84
6.3.4.	Mudanças da composição de microalgas durante a formação do biofilme.....	89
6.3.5.	Composição bioquímica do biofilme	93
6.4.	Conclusões	95
6.5.	Referências.....	95
7.	CAPÍTULO III. EFEITOS DO PERÍODO DE COLHEITA DE BIOFILME MICROALGAL-BACTERIANO CULTIVADO EM ESGOTO DOMÉSTICO NA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E BIOPRODUTOS	103
7.1.	Introdução	104
7.2.	Materiais e métodos.....	106
7.2.1.	<i>Design</i> do reator de biofilme.....	106
7.2.2.	Coleta e caracterização do esgoto doméstico e inóculo.....	108
7.2.3.	Operação dos reatores de biofilme.....	108
7.2.4.	Procedimentos analíticos	109
7.2.5.	Análise estatística.....	112
7.3.	Resultados e discussão	112
7.3.1.	Caracterização das condições ambientais e tratamento de esgoto doméstico	112
7.3.2.	Crescimento do biofilme	116
7.3.3.	Produção de bioprodutos no biofilme	118
7.3.4.	Implicações para definição do período de colheita e considerações sobre o efeito de ampliação de escala sob a perspectiva de recuperação de bioprodutos	122
7.4.	Conclusões	124
7.5.	Referências	124
8.	Conclusão geral.....	131
9.	Sugestões para pesquisas futuras.....	132
	REFERÊNCIAS.....	133
	APÊNDICE A.....	136
	APÊNDICE B.....	137
	APÊNDICE C	137
	APÊNDICE D	138

1. APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa foi desenvolvida como continuidade aos estudos realizados no Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas (nPA) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa, que foram voltados para o tratamento de águas residuárias em tecnologias baseadas em microalgas, bem como para valorização da biomassa produzida.

Pesquisas anteriores investigaram diferentes sistemas de cultivo de crescimento em suspensão, bem como compararam suas performances. O desempenho de lagoas de alta taxa para o tratamento de diferentes águas residuárias, como esgoto doméstico, efluentes de indústria alimentícia, efluentes agroindustriais como suinocultura e bovinocultura, além da indústria de cerveja foi avaliado. Outros estudos abordaram estratégias de cultivo para o aumento de produtividade com pré-desinfecção (ASSEMANY et al., 2015), adição de gás de combustão para suplementação de gás carbônico (ASSIS et al., 2019) e efeitos da radiação solar (COUTO et al., 2015).

No que diz respeito a rotas de valorização da biomassa, esforços foram realizados para produção de biodiesel (ASSEMANY et al., 2015), biogás (ASSEMANY et al., 2018a, 2016, 2018b), bio-óleo, briquetes, *hydrochar* (CASTRO et al., 2021), e biofertilizantes (CASTRO et al., 2017, CASTRO et al., 2020; LORENTZ et al., 2020; PEREIRA et al., 2021; SILVA et al., 2021). Outros estudos do mesmo grupo de pesquisa foram voltados para avaliação de ciclo de vida da produção e valorização de biomassa (CASTRO et al., 2020b; FERREIRA et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2021; SOUZA et al., 2019)

Recentemente, sistemas de cultivo baseado em biofilme têm atraído atenção. Nesse sentido, reatores de biofilme, operados sozinhos ou compondo um sistema híbrido (acoplado em lagoas de alta taxa) vêm sendo investigados. Seu desempenho foi avaliado para produção e colheita de biomassa, bem como para o tratamento de águas residuárias. Dentre os avanços relatados, foi observado que, quando comparada a lagoa de alta taxa, o sistema híbrido dispensa a necessidade de adição de gás carbônico (ASSIS et al., 2017), aumenta em cerca de 2,6 vezes a produção de biomassa (ASSIS et al., 2020), garantindo maior eficiência e simplicidade de colheita (ASSIS et al., 2020; FERREIRA et al., 2020). Sobre o seu *design*, verificou-se que o ângulo de inclinação não afeta na produtividade de biomassa e que o poliéster,

quando comparado ao algodão e náilon, se mostrou mais favorável para alcançar alta produtividade de biomassa. A respeito de sua performance ambiental, foi relatado que, para os sistemas híbridos, o tipo de material suporte é input crítico que afeta expressivamente a geração de impactos ambientais (MAGALHÃES et al., 2021). Quando comparado ao cultivo suspenso seguido por colheita via sedimentação gravitacional, ainda que o sistema híbrido demande maior consumo de energia (para recirculação do meio de cultivo) e material para a aderência do biofilme, seu desempenho ambiental é mais favorável (FERREIRA et al., 2020).

Os estudos anteriores descreveram resultados promissores e que indicam benefícios do emprego de reatores de biofilme na produção de biomassa e tratamento de águas residuárias. Contudo, como os estudos de sistemas de crescimento aderido ainda é um campo de pesquisa novo, avanços são necessários para otimizar essa biotecnologia. Dessa forma, o presente estudo buscou compreender oportunidades para recuperar nutriente e bioprodutos, bem como trazer orientações a respeito do período de colheita do biofilme. Nesse sentido, reatores de biofilme foram operados sobre condições ambientais e alimentados com esgoto doméstico (após o seu tratamento primário). O conteúdo de nitrogênio e sucessão da comunidade de microalgas ao longo da formação do biofilme foram avaliadas, bem como, os efeitos do período de colheita sobre a produtividade de biomassa e de carotenoides totais.

Esse documento foi organizado em três capítulos principais, além da introdução geral, hipóteses, objetivos e conclusão geral. O primeiro capítulo apresenta uma revisão sobre o crescimento aderido de biomassa sob a forma de biofilme, abordando, especialmente, sua aplicação ao tratamento de águas residuárias. Os principais conceitos do desenvolvimento do biofilme e os principais resultados, até então relatados na literatura, referente a performance técnica, econômica e ambiental desses sistemas foram compilados. O segundo capítulo trata-se de um estudo voltado para compreensão da dinâmica da comunidade de microalgas e recuperação de nitrogênio pela biomassa aderida, avaliados ao longo do desenvolvimento do biofilme. O rendimento da biomassa, taxas de remoção de nutrientes, bem como a composição bioquímica do biofilme foram relatados. Por fim, o capítulo III se dedicou a investigar os efeitos de diferentes períodos de colheita do biofilme, bem como seu efeito sobre a eficiência de tratamento, produtividade de biomassa e de carotenoides.

2. INTRODUÇÃO GERAL

O biofilme é uma forma de vida, no qual a comunidade microbiana cresce aderida em um material suporte e imersa em uma matriz de substâncias extracelulares poliméricas. De longa data, os biofilmes bacterianos já vêm sendo investigados e aplicados ao tratamento de águas residuárias. Para tanto, existem diversas configurações de tecnologias para esse fim, como o filtro biológico percolador, o biofiltro aerado submerso, o filtro aeróbio submerso, os biodiscos, reatores com leitos fluidizados ou expandidos, dentre outros. Recentemente, o biorreator de membranas e leito móvel de biofilme vem atraindo a atenção de pesquisadores, ao combinar os benefícios de membrana e biofilme para o tratamento de águas residuárias (SAIDULU; MAJUMDER; GUPTA, 2021).

No que diz respeito às tecnologias baseadas em microalgas, os reatores de crescimento aderido também têm ganhado interesse científico. Há uma grande variedade de reatores, como reator rotativo de biofilme, *algal turf scrubber*, reator de painel (vertical ou inclinado), dentre outros. Contudo, ao contrário dos reatores de biofilme bacterianos, cujo principal objetivo é a remoção de matéria orgânica, os biofilmes de microalgas oferecem tratamento terciário às águas residuárias. Um grande atrativo desses sistemas de cultivo é a possibilidade de otimizar a etapa de colheita, que ainda é apontada como um gargalo para a produção de biomassa de microalgas. Além disso, alguns estudos também relataram que o cultivo aderido oferece maior produtividade quando comparado ao cultivo suspenso (LEE et al., 2014; WANG et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

No biofilme de microalgas cultivados em águas residuárias há predominância de algas, mas a microbiota também é formada por bactérias e outros microrganismos, como fungos e protozoários (WANG et al., 2018). Apesar da simbiose entre bactérias e microalgas já ser explorada no tratamento de águas residuárias, o biofilme microalgal-bacteriano ainda foi pouco explorado, tanto em termos de produção de microalgas, quanto do seu papel no tratamento. Os reatores de biofilme microalgal representa um campo de pesquisa em estágio inicial (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019) e ainda são necessários estudos em maiores escalas e condições outdoor (ZHANG et al., 2020). Ainda há muitos fatores que influenciam no desenvolvimento do biofilme que ainda não são compreendidos ou continuam ambíguos (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

Dentre os diversos fatores que influenciam no desenvolvimento do biofilme, sabe-se que a produtividade da biomassa varia com o tempo de cultivo (JOHNSON; WEN, 2010; CHOUDHARY et al., 2017). SHEN et al. (2014) demonstraram que, em condições suficientes de nitrogênio, obtém-se quantidades maiores de biomassa ao realizar a colheita com menor tempo de cultivo. Assim, como o padrão de crescimento está associado à disponibilidade e assimilação dos nutrientes (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019), é possível que, conforme o biofilme se desenvolva, o crescimento de microalgas contribua para o aumento de bioprodutos, como nutrientes ou outros compostos bioquímicos, na biomassa. Como a maioria dos estudos foram realizados para produção de biocombustíveis (SINGH; PATIDAR, 2021), ainda há um amplo campo para estudo, pois a versatilidade das microalgas permite a sua aplicação em outras rotas como, por exemplo, para produção de pigmentos, ácidos graxos e outros produtos de alto valor agregado.

Já foi demonstrado que a variação do período de colheita garantiu biofilmes com diferentes produtividades de ácidos graxos (JOHNSON; WEN, 2010). Como há um gradiente de luz no biofilme à medida com que ele se torna mais espesso, acredita-se que também ocorra um gradiente de pigmento devido a adaptação do conteúdo de pigmento celular (PODOLA; LI; MELKONIAN, 2017), o que reforça a oportunidade para investigar rotas de valorização associadas aos pigmentos.

Existem poucas informações a respeito das condições operacionais e sobre a sua dinâmica na composição dos microrganismos (ZHANG et al., 2020). O período de colheita do biofilme ainda é um parâmetro que requer padronização e recomendações. Estas respostas são essenciais para a inserção das tecnologias em escala real, especialmente no tratamento de águas residuárias. Com envelhecimento do biofilme, por exemplo, pode ocorrer redução da eficiência de tratamento das águas residuárias e, por isso, definir o período de colheita é uma questão importante (HUANG et al., 2019). Logo, é necessário que estudos se dediquem a compreender e otimizar o desenvolvimento de biofilme, durante o tratamento de águas residuárias, por meio de estratégias operacionais específicas (ZHANG et al., 2020).

Diante disso, a presente pesquisa tem por objetivo revisar os principais avanços das tecnologias de cultivo aderido baseado em biofilme, dentro do contexto de tratamento de águas residuárias, além de investigar o potencial do biofilme para recuperação de nitrogênio e carotenoides. Diferentes períodos de colheita foram avaliados, e seus efeitos foram estudados na produção de biomassa e carotenoides.

3. HIPÓTESES

Há um aumento do teor de nitrogênio ao longo da formação do biofilme.

A produtividade de biomassa total e de clorofila-a do biofilme aumenta com a diminuição do período de colheita.

A produtividade de carotenoides totais do biofilme é maior em intervalos mais curtos de colheita.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de um reator de biofilme para recuperar nitrogênio, bem como avaliar os efeitos de diferentes períodos de colheita sobre o tratamento de esgoto doméstico, produtividade de biomassa e carotenoides totais.

4.2. Objetivos específicos

- Revisar os principais fundamentos dos sistemas de crescimento aderido e avanços mais atuais de reatores e seus desempenhos técnico, ambiental e econômico;
- Determinar o teor de nitrogênio ao longo da formação do biofilme;
- Elaborar um balanço de massa de nitrogênio durante o tratamento de esgoto doméstico em reator de biofilme;
- Determinar taxas de remoção de nitrogênio do efluente e sua recuperação pelo biofilme;
- Caracterizar quanti e qualitativamente a comunidade de microalgas ao longo do desenvolvimento do biofilme;
- Avaliar o efeito de diferentes intervalos de colheita na eficiência do tratamento de esgoto doméstico;
- Determinar a produtividade de biomassa do biofilme colhido em diferentes períodos de colheita; e,
- Determinar concentração de carotenoides de biofilme colhido em diferentes períodos de colheita.

5. CAPÍTULO I. REATORES DE BIOFILME COMO INOVAÇÃO PARA PRODUÇÃO E COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS

5.1. Introdução

As microalgas são organismos que podem usar luz, gás carbônico (CO₂), água e nutrientes para sua síntese celular. Sua biomassa é rica em carboidratos, lipídios, polissacarídeos, proteínas, pigmentos, dentre outras substâncias, e pode ser convertida em diversos bioprodutos e bioenergias. Dentre os seus usos múltiplos, destaca-se a sua valorização na produção de pigmentos, suplementos alimentares, biofertilizantes, biochar, biogás, bioetanol, biodiesel e ração animal.

Esses microrganismos possuem maior taxa fotossintética do que as plantas terrestres devido à sua estrutura celular mais simples e maior facilidade de acesso ao CO₂ e nutrientes, o que resulta em uma alta produtividade de biomassa (MENDONÇA et al., 2021). Essas características, somadas à necessidade de desenvolver fontes de energia mais limpas e que não coloquem em risco a segurança alimentar global, impulsionam o desenvolvimento de bioenergia à base de microalgas e biocombustíveis de terceira geração. Contudo, como os biocombustíveis a base de microalgas são produtos de baixo valor de mercado, ainda são necessários esforços para viabilizar economicamente o seu uso, pois os custos de operação e insumos para sua produção, associados às baixas produtividades dos sistemas de cultivo suspenso, reduzem o lucro final.

Apesar dos desafios que ainda existem para consolidar a produção e valorização de muitos produtos de biomassa microalgal, acredita-se que ela é uma matéria-prima promissora e muitos esforços vêm sendo realizados para promover a sua popularização. As microalgas são vistas como uma solução ambiental que pode contribuir para mitigar muitos problemas atuais e futuros como a contaminação de água, escassez de recursos e emissões de gases de efeito estufa (MENDONÇA et al., 2021). Como elas são capazes de se desenvolver em águas residuárias, o tratamento com tecnologias à base de microalgas permite não só a remoção de nutrientes, mas também sua recuperação por meio de sua biomassa (MENDONÇA et al., 2021). O efluente tratado, por sua vez, pode ser reciclado em vários fins não potáveis (COUTO; CALIJURI; ASSEMANY, 2020), colaborando para o aumento da segurança no abastecimento, redução de consumos de energia/insumos nos sistemas de tratamento de água (MENDONÇA et al., 2021) e, até mesmo, para recuperar macro

e micronutrientes que permaneceram no efluente tratado. Do ponto de vista econômico, essa abordagem ainda evita gasto com o consumo de água e fertilizantes durante a etapa de cultivo de microalgas.

Em uma perspectiva de bioeconomia circular, as águas residuárias de diferentes origens são entendidas como um recurso valioso a ser recuperado, ricas em energia (LI et al., 2019) e nutrientes (NAGARAJAN et al., 2020). Diante da crise de recursos e as preocupações com a poluição ambiental, existe uma pressão para que as estações de tratamento de águas residuárias (ETARs) convencionais sejam atualizadas (LI et al., 2019), de modo a alcançar maior sustentabilidade econômica e ambiental.

O uso de biotecnologias de microalgas para o tratamento de águas residuárias já foi investigado para esgoto doméstico (ASSIS et al., 2019; POSADAS et al., 2015; ASSIS et al., 2020), efluentes de suínos e bovinos (CHOUDHARY et al., 2017; LORENTZ et al., 2020) e processamento de alimentos (ASSEMANY et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; TANGO et al., 2018). Dentre as limitações dessa tecnologia, destaque-se que para tratar águas residuárias com altas concentrações de matéria orgânica, principalmente em lagoas de alta taxa (LATs), é necessário grandes requisitos de área e uma etapa posterior para separação e colheita da biomassa (TORRES-FRANCO et al., 2020). O crescimento das microalgas é limitado pelas características das águas residuárias. Os sólidos suspensos bloqueiam a incidência de luz no meio de cultivo. A proporção desequilibrada de macronutrientes afeta a remoção destes compostos das águas residuárias e, conseqüentemente, a produção de biomassa (TORRES-FRANCO et al., 2020). Além disso, altas cargas orgânicas, presença de compostos tóxicos e elevada concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) podem inibir o crescimento de microalgas (NAGARAJAN et al., 2020; TORRES-FRANCO et al., 2020). Dessa forma, é necessário incentivar estudos que otimizem a produção de biomassa acoplada ao tratamento de águas residuárias para que essa prática se consolide em escala real.

No que diz respeito aos sistemas de cultivo de microalgas, atualmente, a maioria dos estudos são voltados para o cultivo suspenso (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019; TONINELLI et al., 2016). A lagoas e outros fotobiorreatores (FBR) têm sido amplamente estudados nos últimos anos (ASSIS et al., 2019; COUTO et al., 2015; SUTHERLAND et al., 2020).

As lagoas são uma tecnologia de simples construção e menor custo, que foi desenvolvida para o cultivo em escala industrial (MATHIMANI et al., 2019). A LAT, por exemplo, pode ser facilmente inserida em uma ETAR, como unidade de tratamento secundária ou terciária, dependendo das características do efluente (COUTO; CALIJURI; ASSEMAN, 2020). Contudo, o *design* das lagoas e condições de cultivo provocam uso menos eficiente de luz e CO₂ por parte das microalgas, resultando em produtividades mais baixas. Os FBRs, por sua vez, surgiram como alternativa para o cultivo de microalgas com a proposta de reduzir as necessidades de água, limitando as perdas devido à evaporação, e, potencialmente, melhorar a produtividade pela maior disponibilidade de luz solar (DEROSE et al., 2019). A principal desvantagem dos FBRs é o gerenciamento de oxigênio, pois requer estações de desgaseificação adequadas (MATHIMANI et al., 2019), necessidade de sistema de troca de ar e controle de temperatura (arrefecimento), o que eleva os custos de produção.

Os sistemas de cultivo mencionados são baseados no cultivo suspenso de biomassa, em que as células se encontram dispersas na coluna d'água. Dentre os gargalos desse tipo de cultivo em larga escala, destaca-se a dificuldade em recuperar a biomassa (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019) e a baixa concentração celular. A etapa de colheita é dificultada pelo pequeno tamanho das células de microalgas (2 – 20 µm), sua superfície negativa, que promove a estabilidade coloidal em suspensão, e seu crescimento disperso com densidade próxima ao meio de cultivo (SINGH; PATIDAR, 2018).

Diante disso, os sistemas com cultivo aderido, dentre eles o em forma de biofilme, vem atraindo atenção, principalmente por facilitar a etapa de colheita. Os biofilmes são diferentes formas de vida onde os microrganismos crescem fixados em um substrato (material suporte) (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Assim, a etapa de colheita pode ser realizada, de forma simples, por meio de raspagem. Esses sistemas ainda foram pouco investigados (DEROSE et al., 2019), mas sua aplicação no tratamento de águas residuárias ganhou recente interesse científico (MANTZOROU et al., 2018).

O reator de biofilme (RB) oferece a vantagem de desvincular os tempos de detenção hidráulica e de retenção dos sólidos, o que aumenta o crescimento e acúmulo de biomassa e promove maior remoção de nutrientes em um reator mais compacto (GROSS; JARBOE; WEN, 2015; ZHUANG; LI; NGO, 2020). Além disso, a produção de biomassa pode ser comparável ou até mesmo superior à mesma espécie

cultivada de forma suspensa (KATARZYNA; SAI; AVIJEET SINGH, 2015). Contudo, ainda não há na literatura um consenso com relação a produtividade da biomassa aderida ser maior do que a biomassa suspensa (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). O uso de reatores no cultivo aderido em estações de tratamento de efluentes ainda não é empregado, pois seu design e a operação em larga escala ainda não foram totalmente investigados na literatura (KESAANO; SIMS, 2014). Otimizar o crescimento de biofilme sob vários parâmetros ambientais é um desafio (KESAANO; SIMS, 2014).

O presente estudo buscou revisar os avanços e limitações atuais do crescimento aderido e da sua aplicação no tratamento de águas residuárias. Os principais conceitos do crescimento aderido em forma de biofilme foram abordados, detalhando os fatores que influenciam a sua formação, gêneros e espécies mais comuns, as interações nos consórcios de microalgas e bactérias, e tipos de reatores de biofilme. Além disso, os avanços técnicos, ambientais e econômicos mais recentes foram aqui apresentados.

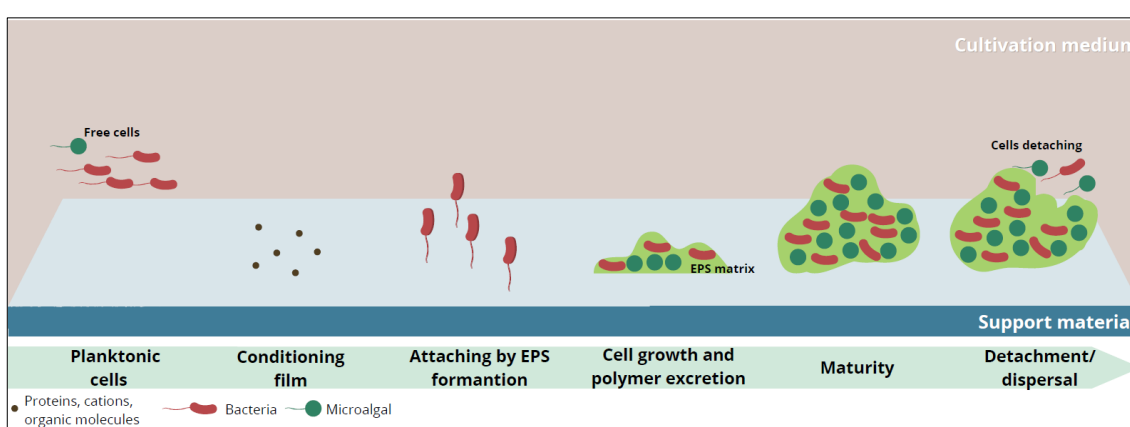
5.2. Desenvolvimento do biofilme

O biofilme pode ser entendido como consórcio de microrganismos incorporados em substâncias poliméricas extracelulares (EPS), formando uma estrutura complexa aderida em uma superfície sólida (MANTZOROU et al., 2018). EPSs são compostas por moléculas de proteínas, fosfolipídios, polissacarídeos, ácidos nucleicos e incluem grupos funcionais como grupos fosfóricos, carboxílico, hidroxil e amino (CHRISTENSON; SIMS, 2012; SHEN et al., 2015). Esses polímeros extracelulares são secretados por microalgas e bactérias (LIU et al., 2017). A matriz EPS mantém o biofilme unido e corresponde a um estilo de crescimento protegido de condições ambientais extremas, tais como, flutuação de pH e temperatura, desidratação e produtos químicos nocivos (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Ainda, a matriz EPS representa um compartimento de armazenamento de nutrientes e água (WANG et al., 2018), um ambiente de fácil troca de genes e comunicação celular, além de ser utilizada como um sistema de digestão externa (FLEMMING et al., 2021).

O processo de formação do biofilme (Figura 5.1) é precedido por uma etapa em que ocorre a deposição de macromoléculas de glicoproteínas e polissacarídeos (filme condicionante) no material suporte ao entrar em contato com o meio de cultivo, o que pode favorecer a fixação inicial de células (THOBIE et al., 2022). Acredita-se

que, os estágios iniciais no biofilme sejam marcados por bactérias (colonizadores primários) (BARRANGUET et al., 2004). SIBONI et al. (2007) sugeriram que, no início do desenvolvimento do biofilme, bactérias poderiam se aderir ao material suporte para degradar o carbono orgânico total do filme condicionante. Contudo, ROESELERS; VAN LOOSDRECHT; MUYZER (2007) observaram que, sob condições diferentes de intensidade de luz (variada em 30, 60 e 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ora bact\u00e9rias ora algas foram colonizadores iniciais, em baixa e alta intensidade de luz, respectivamente.

Figura 5.1 – Etapas da forma\u00e7\u00e3o do biofilme.



Ap\u00f3s essa etapa, o processo de forma\u00e7\u00e3o do biofilme \u00e9 marcado por duas grandes etapas, s\u00e3o elas: (i) ader\u00eancia inicial das c\u00e9lulas ao material suporte por adsor\u00e7\u00e3o f\u00edsica (revers\u00edvel) e (ii) ades\u00e3o das c\u00e9lulas devido a secre\u00e7\u00e3o de EPS (irrevers\u00edvel) (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Na etapa revers\u00edvel ocorrem intera\u00e7\u00f5es c\u00e9lula-material suporte por meio de liga\u00e7\u00f5es fracas, como for\u00e7as de van der Waals e liga\u00e7\u00f5es eletrost\u00e1ticas (THOBIE et al., 2022), quando h\u00e1 condi\u00e7\u00f5es favor\u00e1veis de turbul\u00eancia do meio, a hidrofobicidade e a rugosidade da superf\u00edcie do material suporte (WANG et al., 2018). J\u00e1 na etapa irrevers\u00edvel, ocorre o espessamento do biofilme, onde as c\u00e9lulas se multiplicam e ficam aderidas devido a secre\u00e7\u00e3o de EPS (rea\u00e7\u00f5es bioqu\u00edmicas). A partir de ent\u00e3o, h\u00e1 multiplica\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas j\u00e1 aderidas e c\u00e9lulas no estado planct\u00f4nico se depositam continuamente em camadas superficiais do biofilme (THOBIE et al., 2022).

Dentro do biofilme, a maioria das c\u00e9lulas est\u00e1 ligada ao substrato, enquanto uma pequena parte est\u00e1 suspensa no meio e absorve luz (KATARZYNA; SAI; AVIJEET SINGH, 2015). Em determinada espessura do biofilme, as c\u00e9lulas come\u00e7am

a se desprender do biofilme/material suporte. As perdas de biomassa ocorrem devido a morte celular, *grazing* e parasitismo (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

O biofilme amadurecido possui uma estrutura tridimensional com diferentes microambientes ao redor das células e movimento químico de nutrientes (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). A movimentação de nutrientes (BERNER; HEIMANN; SHEEHAN, 2015) e a transferência de CO₂ e O₂ (BLANKEN et al., 2017) dentro do biofilme ocorre por difusão. A luz e os nutrientes estão disponíveis apenas na superfície do biofilme estabelecido, o que cria um gradiente desses fatores que tende a diminuir para camadas mais internas (WANG et al., 2018). Assim, as células se adaptam as condições ambientais e bioquímicas a qual se encontra ou se anexam em zonas que são mais adequadas para elas (BERNER; HEIMANN; SHEEHAN, 2015). Isso resulta em uma estrutura heterogênea, onde as microalgas heterotróficas e bactérias anaeróbias se desenvolvem em camadas mais profundas, enquanto as microalgas fotoautotróficas em camadas mais expostas à luz (BERNER; HEIMANN; SHEEHAN, 2015). Apesar da adaptação dos microrganismos, é fundamental a colheita periódica da biomassa aderida, para evitar a privação de nutrientes a células de camadas inferiores e, conseqüentemente, perda do biofilme (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

5.3. Consórcio microalgal-bacteriano e suas interações

Existem biofilmes compostos por uma única espécie ou por várias espécies. Os biofilmes comumente utilizados no tratamento de águas residuárias são caracterizados por ter várias espécies e são constituídos, principalmente, por microalgas fotoautotróficas e bactérias heterotróficas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). O biofilme composto por bactérias e microalgas é mais estável do que aqueles formados apenas por um ou por outro (ROESELERS; VAN LOOSDRECHT; MUYZER, 2007). A água residuária, normalmente, contém bactérias, protozoários, fungos e, quando tratada em unidades baseadas em microalgas, esses microrganismos crescem ao longo do tratamento. A presença de microrganismos nas águas residuais contribui para redução do tempo de latência, acelerando o crescimento aderido (SHEN et al., 2015). Maior diversidade ainda colabora para o maior espessamento do biofilme (IRVING; ALLEN, 2011) e produtividade de biomassa (TSOLCHA et al., 2018). IRVING; ALLEN (2011) observaram que, sob condições estéreis, a *Chlorella vulgaris* se manteve em maior proporção do modo planctônico,

enquanto em condições não estéreis (em águas residuárias) houve predomínio do crescimento aderido, bem como ocorreu menor suscetibilidade para desprendimento por agitação.

O consórcio e a biodiversidade, tornam o biofilme mais robusto, deixando os microrganismos mais resistentes às flutuações ambientais e à invasão por outras espécies (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Na dinâmica do consórcio entre microalgas e bactérias ocorrem tanto interações cooperativas, que promovem o crescimento mútuo, quanto competitivas, provocadas pela disputa por nutrientes e espaço (LIU et al., 2017). As interações são determinadas em função das cepas de microalgas e bactérias, das condições de cultivo, tempo de detenção hidráulica, fatores ambientais, mas principalmente da disponibilidade de nutrientes (ZHANG et al., 2020). Nas interações cooperativas, as microalgas fornecem oxigênio e carbono orgânico às bactérias, enquanto as bactérias fornecem CO₂, nutrientes, vitaminas, auxinas e minerais às microalgas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017; LIU et al., 2017). Por outro lado, nas interações competitivas, as microalgas secretam substâncias antibacterianas para inibir o crescimento bacteriano e as bactérias produzem antibiótico que interfere na fotossíntese ou metabólicos algicidas que inibem o crescimento das microalgas (LIU et al., 2017).

No que se refere à eficiência do tratamento, a presença de organismos autotróficos e heterotróficos no biofilme otimiza a utilização total dos nutrientes e poluentes presentes nas águas residuárias (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). A presença de organismos com diferentes requisitos nutricionais, contribui com processos complexos de degradação (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017) e remoção avançada de nutrientes (LIU et al., 2017).

5.4. Composição de espécies em biofilmes

Na literatura, foram identificadas espécies capazes de se estabelecerem em biofilmes cultivados em diferentes meios de cultivo (Figura 5.2A) e materiais suportes (Figura 5.3B) na literatura. A disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo é o principal fator que determina a composição das espécies de microalgas e bactérias, conforme a fase de crescimento e condições de cultivo (ZHANG et al., 2020). No cultivo suspenso, muitos trabalhos relataram a dominância/presença dos gêneros *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. no tratamento de diferentes tipos de águas residuária (ASSEMANY et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; POSADAS et al., 2015; TANGO et

al., 2018). Essas espécies se adaptam bem a este meio de cultivo devido à sua tolerância a uma ampla faixa de pH e temperatura (ASSEMANY et al., 2016), assim como capacidade de suportar elevada carga orgânica.

Similarmente, no cultivo aderido, as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* também se destacam e foram reportadas, especialmente, em biofilmes cultivados em águas residuárias oriundas de fontes urbana e de suinocultura, bem como em meio sintético. A respeito do tipo de material suporte, ao menos treze tipos de materiais foram encontrados na literatura capazes de permitir o crescimento de biofilme de *Chlorella vulgaris* (seja em cultivo puro ou misto). As observações de JOHNSON; WEN (2010) reforçam a capacidade das algas do gênero *Chlorella* são capazes de formar biofilme em diversos materiais, tais como poliestireno, papelão, tecido de polietileno e esponja bucha. Além dessas espécies, destacaram-se outras espécies dos gêneros *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp., bem como dos gêneros *Oscillatoria*, *Nitzschia*, *Leptolyngbya*, *Phormidium* e *Pseudanabaena* (Figura 5.2).

O processo de formação de biofilmes de microalgas ainda não foi totalmente compreendido e acredita-se que seu desenvolvimento (formação e crescimento) pode variar conforme as espécies que participam e das interações estabelecidas entre si (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Isso porque, dentre outros fatores, os mecanismos de ligação e produção de EPS variam conforme a espécie e suas propriedades, o que resulta em menor ou maior facilidade de aderência. As cianobactérias filamentosas são apontadas como um grupo de espécies estratégicas para o cultivo aderido. Elas são formadas por múltiplas células (WANG; LIU; LIU, 2017) e podem suportar a estrutura de um biofilme (STAUCH-WHITE et al., 2017). A adesão de algas verdes filamentosas ao material suporte se dá por fixação rápida (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). As diatomáceas são produtoras abundantes de EPS (SHEN et al., 2014). ASSIS et al. (2019) compararam três diferentes materiais suportes (algodão, náilon e poliéster) e relataram um melhor desenvolvimento de microrganismos filamentosos no poliéster. Além disso, algumas cepas precisam do auxílio de outros microrganismos para formar biofilme (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

Esses diferentes mecanismos de aderência são importantes frente as condições hidrodinâmicas do meio de cultivo. KANGAS; MULBRY (2014) observaram a presença de diferentes espécies em função da energia oriunda da vazão do

tombamento intermitente das calhas sobre o biofilme em um reator *algal turf scrubber* (ATS). Os autores relataram que na região do biofilme onde ocorria maior energia de fluxo houve um monocultivo de *Ulothrix*, enquanto nas demais foram observadas a diatomáceas filamentosa do gênero *Melosira*, clorofíceas filamentosas dos gêneros *Spirogyra*, *Microspora* e *Ulothrix* e cianobactérias dos gêneros *Oscillatoria* e *Phormidium*.

OZKAN; BERBEROGLU (2013) investigaram as interações célula-célula e célula-substrato das algas verdes de água doce *Ankistrodesmus falcatus* var. *stipitatus* (UTEX B 242), *Botryococcus braunii* (UTEX 572), *B. sudeticus* (UTEX B 2629), *Chlorella vulgaris* (UTEX 2714), *Nannochloris oculata* (UTEX LB 1998) e *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 1237) e os substratos vidro, óxido de índio-estanho, aço inoxidável, acrílico ou policarbonato, poliestireno e polietileno. Os autores relataram que, em todos os sistemas avaliados, o mecanismo ácido-base predominou nas interações célula-substrato e célula-célula. Além disso, foi identificado que as espécies hidrofóbicas *A. falcatus*, *B. braunii* e *B. sudeticus* são fáceis de serem cultivadas como biofilme devido à sua forte atratividade em ambas as interações. Acredita-se que microalgas com maior hidrofobicidade possuem forças de adesão mais fortes (SHEN et al., 2015). Em relação à produção de EPS, a espécie *B. braunii* se destaca, inclusive em comparação a outros microrganismos que podem estar presentes nas águas (SHEN et al., 2015).

SHEN et al. (2014) compararam produtividade de biomassa e taxa de adesão da *Scenedesmus dimorphus* (UTEX 417), *Chlorella protothecoides* (UTEX 1806), *C. vulgaris* (FACHB-31), *Scenedesmus obliquus* (FACHB-416), *Scenedesmus dimorphus* (FACHB-496) e *Chlorococcum* sp., utilizando aço inoxidável como material suporte e em meio basal modificado. Os melhores resultados de produtividade e taxa de adesão ($0,53 \pm 0,05 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e $53,3 \pm 0,8\%$) se deram para a *Chlorococcum* sp., justificados pelo seu mecanismo de fixação e capacidade de produzir EPS.

Alguns trabalhos relataram uma mudança entre as espécies presentes e/ou mais abundantes na fase inicial e final da formação do biofilme (CHOUDHARY et al., 2017; PAQUETTE et al., 2020; ASSIS et al., 2020). PAQUETTE et al. (2020) observaram mudanças na comunidade fotoautotrófica de um biofilme inoculado com *Scenedesmus obliquus*. Ao entrar em contato com água residuária, o gênero *Chlorella* e a cianobactéria *Leptolyngbya* se estabeleceram, assim como diatomáceas e dinoflagelados. A espécie inoculada teve abundância menor do que esperado (PAQUETTE et al., 2020).

A mudança da composição dos microrganismos e suas interações em consórcios microalgal-bacteriano ainda foram pouco discutidas na literatura (ZHANG et al., 2020). Dentre os fatores que a provoca, as competições por nutrientes, luz e espaço são apontados por provocar constante adaptações (FLEMMING; WINGENDER, 2010) e até mesmo seleção de espécies (DI PIPPO et al., 2014).

SEKAR et al. (2002) reportaram que alterações na relação N:P do meio de cultivo se correlacionou com percentual de espécies de clorófitas. Dessa forma, mudanças no meio de cultivo e o próprio espessamento do biofilme provocam alterações na composição e abundância relativa das espécies.

5.5. Fatores que influenciam na formação do biofilme

Além das espécies e suas interações, os parâmetros ambientais, como as condições climáticas ou operacionais, influenciam na formação e crescimento da biomassa aderida. Fatores que interferem no cultivo suspenso, como intensidade de luz, nutrientes, carbono inorgânico, oxigênio dissolvido, temperatura, pH e tempo de retenção hidráulica também interferem no cultivo aderido (WANG et al., 2018). Para o crescimento aderido, outros fatores importantes, ou que interferem de forma mais intensa, são: (i) características do material suporte (iii) velocidade do fluxo (iv) tensão sobre o biofilme; (v) período de colheita (raspagem do material suporte) (LIU et al., 2017; MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019; WANG et al., 2018).

Para o crescimento aderido é importante garantir não só condições ótimas para o desenvolvimento dos microrganismos, mas também para sua aderência. A matriz EPS é essencial para permitir o espessamento e manter unido o biofilme. A secreção de EPS varia em função da idade da célula (WANG et al., 2018), sendo que ela aumenta com a idade (ROY; MOHANTY, 2019). A composição do EPS é apontada como um ponto muito importante para formação do biofilme (SHEN et al., 2015). O EPS pode ser dividido em *soluble EPS* e *bound EPS*, ambos constituídos principalmente por proteínas e polissacarídeos, contudo o primeiro tem pouco efeito na adesão (SHEN et al., 2015), enquanto o segundo é considerado o principal componente estrutural da matriz do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Segundo SHEN et al. (2015), o teor de proteína no *bound EPS* é mais significativo para formação de EPS e, conseqüentemente, na produção e taxa de adesão da biomassa. Assim, a concentração de nitrogênio (N) contribui não só para o crescimento da biomassa, mas também para melhorar as características da matriz EPS. No crescimento aderido, não só a taxa de crescimento da biomassa contribui para a produtividade do biofilme, mas também a taxa de adesão (SHEN et al., 2015). Dessa forma, quanto maior a aderência de células suspensas no meio de cultivo no material suporte, maior também será a produção de biomassa aderida.

O padrão de crescimento do biofilme é caracterizado pelas tendências de remoção de nutrientes (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Os requisitos nutricionais de nitrogênio (N), fósforo (P) e outros elementos podem variar em função da cepa de microalga (KATARZYNA; SAI; SINGH, 2015). Em condições de deficiência de nutrientes, as EPSs podem ser degradados pelas microalgas com dois diferentes propósitos: para se alimentarem ou para que se destacarem do biofilme e buscarem lugares mais favoráveis para o seu desenvolvimento (SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2013). Por esse mesmo motivo, não são recomendados longos intervalos entre as colheitas. Por outro lado, intervalos muito curtos podem provocar constantes fases de retardo das células microalgais, exigindo que elas estejam sempre se adaptando ao ambiente (WANG et al., 2018). Maior período de cultivo é interessante para o cultivo com deficiência de N de modo a aumentar a produção de biomassa, por outro lado, em condições suficientes de N, ocorre o efeito contrário. Nesse último caso, maior período de colheita seria mais interessante, o que possivelmente garantirá maior quantidade de biomassa total.

SHEN et al. (2014) investigaram a influência da concentração inicial de N total durante o cultivo de *Chlorococcum* sp. na forma de biofilme. Os autores utilizaram água residuária de bovinocultura (centrifugada e autoclavada) como meio de cultivo e plástico reforçado com fibra de vidro como material suporte. Os resultados apontaram que a produção de biomassa aderida aumentou com a concentração inicial de N total, que variou de 30 a 70 mg L⁻¹. Além disso, em condições de pH = 7,5, período de cultivo = 13 dias e volume do meio de cultivo = 350 mL, a concentração ótima foi de 70 mgL⁻¹.

Um fator importante, especialmente, para o crescimento das microalgas é a intensidade de luz. Quando comparado ao cultivo suspenso, acredita-se que no cultivo aderido há melhor distribuição de luz porque ela não é limitada pela densidade da cultura (KATARZYNA; SAI; SINGH, 2015; MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019; ZHUANG et al., 2018). Apesar da penetração da luz na camada superior, em ambos os tipos de cultivo, ser próxima, no cultivo suspenso ela diminui conforme a profundidade da coluna d'água do meio de cultivo (LEE et al., 2014).

SCHNURR; ESPIE; ALLEN (2014) verificaram que a direção da luz (em 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) não afeta o crescimento aderido e a espessura do biofilme a longo prazo (26 dias), contudo, como ela afeta a concentração de células suspensas, em curto prazo o crescimento do biofilme foi afetado (7 dias). Esse resultado converge com as

etapas de formação do biofilme, uma vez que o processo se inicia com a adesão de células suspensas. ROSLI et al. (2020) relataram que o aumento da intensidade de luz (variando de 100 – 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) favoreceu a remoção de nitrato por *Chlorella vulgaris* cultivada em um bioreator de leito fluidizado. O espectro de luz também afeta o crescimento das microalgas, sendo que para a *Chlorella* sp., os comprimentos de onda azul e vermelha contribuíram mais para o crescimento quando comparado a luz branca, e a primeira resultou em maior teor de lipídios, enquanto a segunda em maior teor de carboidratos na biomassa (YUAN et al., 2020).

Comparando diferentes irradiâncias, DI PIPPO (2014) observaram ora maior abundância de cianobactérias em irradiância baixa e média (30 e 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ora maior colonização por algas verdes em irradiância alta (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), como *Chlorococcum*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus*, que possuem rápido crescimento e foram associadas pelos autores a promover fase de latência mais curta. Ainda, os autores reportaram que uma interação entre irradiância e temperatura pode afetar a síntese de EPS e, em especial, a fase inicial de formação do biofilme.

Com relação a temperatura, sabe-se que a biomassa aderida é mais sensível às flutuações do que a biomassa suspensa, devido a um menor efeito tampão da água, que se encontra em menores quantidades (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Ela afeta a composição e interações das espécies e suas taxas de crescimento. A intensidade de luz (30, 60 e 120 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) afetou a duração da fase inicial de colonização, sendo que quando menor, maior fase de latência (ROESELERS; LOOSDRECHT; MUYZER, 2007).

O pH do biofilme é diferente do meio de cultivo, varia dentro do biofilme e pode influenciar na produção de EPS (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Para o crescimento aderido de *Chlorococcum* sp. em plástico reforçado com fibra de vidro foram encontrados resultados entre 7,5 e 9,0, sendo que o valor ótimo (período de cultivo = 13 dias e volume do meio de cultivo = 350 mL e concentração inicial de N total = 50 mg L^{-1}) foi de 8,0 (SHEN et al., 2014). O pH = 6 pode afetar na adesão das microalgas devido ao enfraquecimento de sua carga superficial negativa, enquanto em pH igual a 9, a produção de EPS pode ser estimulada para que as células se protejam do meio, o que, conseqüentemente melhora na sua fixação em um meio suporte (HOH; WATSON; KAN, 2016)

Em águas residuárias, as formas do carbono inorgânico dissolvido podem estar como dióxido de carbono (aq.), bicarbonato (POSADAS et al., 2013), dióxido de

carbono atmosférico e o carbono inorgânico advindo da degradação das bactérias. Dentro do biofilme, a biodisponibilidade de carbono inorgânico sofre influência do pH não só do biofilme, mas também do meio de cultivo, o que provoca uma limitação de carbono (KESAANO; SIMS, 2014). HUANG et al. (2016) verificaram que o valor crítico de concentração de CO₂ (suplementação) é de 1,5%, sendo que valores abaixo causam inibição devido a insuficiência de carbono e acima não contribuem para o crescimento da biomassa.

5.6. Mecanismo de remoção de nutrientes

Como mencionado anteriormente, a disponibilidade de nutrientes é um fator fundamental para o crescimento do biofilme, sendo determinante para o estabelecimento de espécies e interações. A capacidade de remoção de nutrientes varia conforme o amadurecimento do biofilme. O EPS pode estimular a absorção de N-NH₄⁺ e fosfato por algas (XIAO; ZHENG, 2016). No início da fase de crescimento, quando as células ainda estão assentando e aderindo ao material suporte, a assimilação de nutrientes é baixa, mas à medida que o biofilme se desenvolve, a assimilação aumenta, até que, na fase de morte, diminui novamente conforme as células vão se desprendendo do biofilme (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019).

Acredita-se que para as culturas aderidas há diferenças na resposta às captações e deficiências de nutrientes quando comparado às culturas suspensas (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). No interior do biofilme, os nutrientes são inicialmente absorvidos e armazenados na matriz EPS e, após, eles são lentamente liberados para as microalgas (ZHUANG; LI; NGO, 2020) e bactérias, pois a matriz EPS retarda a difusão de solutos (WANG et al., 2020). Assim, a variação da concentração de nutrientes e outros poluentes no meio de cultura não influencia imediatamente no crescimento da biomassa aderida (ZHUANG; LI; NGO, 2020). As moléculas do meio de cultivo podem ser realizar sorção com moléculas de EPS e aos poros e canais da matriz (FLEMMING et al., 2016), sendo que podem ocorrer ligações químicas ou físicas com muitos compostos orgânicos e inorgânicos devido aos seus abundantes grupos funcionais (XIAO; ZHENG, 2016).

As rotas de remoção de N dependem diretamente do metabolismo do organismo e da sua forma e valência (MENDONÇA et al., 2021). A diversidade de microrganismos no biofilme contribui para remoção de nutrientes através de diversas rotas, sendo elas: absorção de nutrientes inorgânicos, nitrificação e desnitrificação,

volatilização de amônia, oxidação anaeróbia de amônio (ANAMMOX) e adsorção de matéria orgânica e inorgânica (LIU et al., 2017). No processo ANAMMOX, o amônio e nitrato são oxidados (conversão direta) ao gás nitrogênio sob condições anaeróbicas usando nitrito como receptor de elétrons (ZHUANG et al., 2022). O pré-tratamento com desnitrificação parcial (combinado ao ANAMMOX) tem sido sugerido para otimizar o tratamento de N em águas residuárias (ZHANG et al., 2022). ZHANG et al. (2022) observaram uma rápida formação de biofilme devido à alta capacidade de agregação de bactéria ANAMMOX.

As vias de degradação de N pelas bactérias (nitrificação) provocam uma conversão desse nutriente, mas não o removem do efluente (MENDONÇA et al., 2021). Por outro lado, a volatilização de N amoniacal apesar de representar uma via de remoção do N, não contribui com a recuperação desse recurso. Dessa forma, a assimilação de N pelas microalgas deve ser priorizada, pois ela permite tanto a remoção de N do efluente, quanto permite a sua reciclagem ao ficar incorporado em sua biomassa.

A forma de N e a valência do íon, assim como a relação N:P influenciam na produtividade da biomassa aderida e na eficiência de remoção de nutrientes (ROSLI et al., 2019). As microalgas têm preferência em assimilar $N-NH_4^+$, ou seja, na presença de íon amônia e nitrato, o íon amônia é a forma preferencial de N. Elas podem remover 100% do $N-NH_4^+$ de certas águas residuárias (NAGARAJAN et al., 2020). Isso ocorre porque a assimilação de $N-NH_4^+$ ocorre por difusão passiva, sendo que quanto maior a concentração maior será a assimilação, enquanto para o nitrato há um limite máximo para absorção (ZHUANG; LI; NGO, 2020).

A elevação do pH devido a atividade fotossintética resulta não só na volatilização do $N-NH_4^+$, mas também na precipitação do P (em $pH > 9.0$). Devido a isso, muitos trabalhos exploram a adição de CO_2 para controlar o pH em busca de maior recuperação desses macronutrientes. As microalgas podem assimilar a maioria das formas orgânicas e inorgânicas de fosfato após a mineralização por fosfatases e conversão em ortofosfatos (MARKOU; VANDAMME; MUYLEAERT, 2014).

5.7. Reatores de biofilme

Os RBs surgiram como uma inovação tecnológica que, em uma abordagem técnica-operacional apresentam vantagens como a menor demanda por área superficial e maiores produtividades, quando comparados aos sistemas de cultivo

suspensão (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019); a concentração da biomassa em superfícies sólidas facilita o processo de colheita de biomassa, que pode ser realizada pela técnica de raspagem (ZHANG et al., 2018); e, ainda, a biomassa contém baixa quantidade de água, dispensando o processo de desidratação (ZHANG et al., 2018). Além disso, os RBs operam, simultaneamente, como unidades de produção e separação de biomassa (ASSIS et al., 2020). Esta particularidade torna o processo de obtenção da biomassa mais simplificado, com menores custos envolvidos nas demandas energéticas e por água (KHAN et al., 2022; ROSLI et al., 2019).

O caráter promissor dos RBs tem despertado interesse nos pesquisadores e, nesse sentido, diversas configurações de reatores têm sido investigadas tendo como objetivo principal otimizar a produção, colheita e desidratação da biomassa de microalgas. Ao mesmo tempo, as configurações dos reatores abordam uma diversidade de posições, inclinações, materiais suportes aderentes, integração com reatores de cultivo suspensão, tornando os RBs distintos entre si.

5.7.1. Configurações dos reatores de biofilme

Os RBs foram classificados por BERNER; HEIMANN; SHEEHAN (2015) de acordo com a posição relativa do meio de cultivo e das microalgas, sendo divididos em: (i) sistemas constantemente submersos, (ii) sistemas intermitentemente submersos, e (iii) sistemas porosos. Nas duas primeiras categorias, as microalgas estão diretamente submersas sob uma camada do meio de cultivo a todo tempo ou não, respectivamente. Já na terceira, as microalgas crescem no exterior de um material poroso (exposta a fase aquosa), que fornece nutrientes e umidade para as microalgas (BERNER; HEIMANN; SHEEHAN, 2015). Dentro de cada classificação, existem diferentes configurações de reatores, que variam em termos de projeto, geometria e materiais suporte.

Os projetos dos RBs podem considerar os materiais suportes fixos ou livres no meio de cultivo, sendo estes denominados na literatura como biorreatores de leito fixo ou de leito fluidizado, respectivamente. Nos biorreatores de leito fixo, as microalgas aderem na superfície dos materiais suportes e podem ser facilmente colhidas por raspagem. Enquanto nos biorreatores de leito fluidizado os materiais suportes se encontram livres no meio de cultivo, sendo necessário sua retirada para a colheita do biofilme algal. Geralmente, os biorreatores de leito fluidizado requerem

maior volume de meio de cultivo do que os biorreatores de leito fixo (ROSLI et al., 2019). Por outro lado, nos biorreatores de leito fixo podem ocorrer formação espessa de biofilme, que limita a absorção de nutrientes e de luz (SCHNURR; ALLEN, 2015), principalmente quando os materiais suportes estão posicionados ao fundo e na horizontal dos biorreatores.

Ainda, com relação aos RBs com materiais suportes fixos, na literatura são reportados diferentes ângulos de inclinações dos materiais suportes, que variaram de 0,2° a 90° em relação ao plano horizontal (ASSIS et al., 2020; ASSIS et al., 2019; ASSIS et al., 2017; LEE et al., 2014; OZKAN et al., 2012; YU et al., 2020). Existem também os RBs em que os materiais suportes são rotativos (CHRISTENSON; SIMS, 2012; GROSS et al., 2013; GROSS; MASCARENHAS; WEN, 2015). É importante que os projetos considerem inclinações que favoreçam o sentido de adesão das microalgas por gravidade (SUTHERLAND; CRAGGS, 2017).

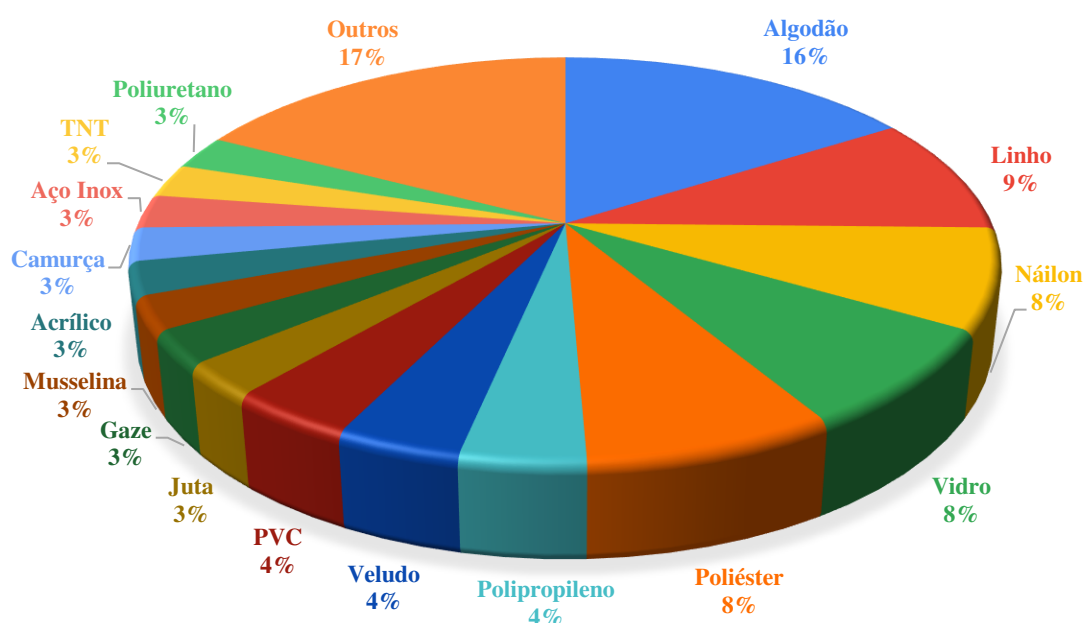
5.7.2. Materiais suporte de aderência

Um componente essencial e que tem grande influência no desempenho do RB e da produtividade de biomassa é o material suporte aderente utilizado. Os consórcios de microalgas e bactérias podem crescer em diversos materiais de superfície áspera e/ou estrutura porosa (ZHANG; ZHANG, 2019). Contudo, para impulsionar o uso comercial da tecnologia de sistema aderido, as pesquisas também precisam se atentar em investigar materiais baratos, leves, finos, de longa duração, resistentes às águas residuárias e que seja de fácil inoculação (TSOLCHA et al., 2018)

Diversos materiais já foram investigados na literatura a fim de atingir alta produtividade de microalgas aderidas e alto teor de lipídeos (ROSLI et al., 2019). Dentre eles, alguns exemplos são: folha de policloreto de vinila (PVC) (BOELEEE et al., 2011), espuma de PVC (POSADAS et al., 2013), algodão (ASSIS et al., 2017; CHRISTENSON; SIMS, 2012; GROSS et al., 2013; KESAANO; SIMS, 2014), espuma de poliestireno (CHOUDHARY et al., 2017), concreto (OZKAN et al., 2012), tecido não tecido (TNT) feito de polipropileno (CHOUDHARY et al., 2017), chapa de policarbonato (ZAMALLOA; BOON; VERSTRAETE, 2013), vidro (SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2013; TSOLCHA et al., 2018), aço inoxidável (SEBESTYÉN et al., 2016), náilon (ASSIS et al., 2019; CHRISTENSON; SIMS, 2012; LEE et al., 2014), poliéster (ASSIS et al., 2019, 2020; YU et al., 2020) e casca de noz (ZOU et al., 2021). Na

Figura 5.3 são apresentados os materiais suportes mais citados nas pesquisas científicas de crescimento aderido de microalgas. Dentre os 20 trabalhos investigados, o algodão foi o material mais testado (16%), seguido pelo linho (9%) e pelo náilon, poliéster e vidro (8%). Outras informações foram sumarizadas na Tabela A1 (APÊNDICE A).

Figura 5.1 – Materiais suportes mais citados nas pesquisas de crescimento aderido de microalgas. Total de pesquisas científicas: 20 (ROSLI et al., 2019; BOELEEE et al., 2011; (POSADAS et al., 2013; ASSIS et al., 2017; CHRISTENSON; SIMS, 2012; GROSS et al., 2013; CHOUDHARY et al., 2017; OZKAN et al., 2012; ZAMALLOA; BOON; VERSTRAETE, 2013; SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2013; TSOLCHA et al., 2018; SEBESTYÉN et al., 2016; ASSIS et al., 2019; LEE et al., 2014, ASSIS et al., 2020; YU et al., 2020; ZOU et al., 2021; ZHANG et al., 2018a; ZHANG et al., 2018b; ZHAO et al., 2018).



Alguns estudos se dedicaram a comparar diferentes materiais suportes (ASSIS et al., 2019; CHRISTENSON; SIMS, 2012; GROSS et al., 2013; LEE et al., 2014; YU et al., 2020). CHRISTENSON; SIMS (2012) compararam diferentes materiais suporte em RB rotacional, utilizando água residuária doméstica secundária como meio de cultivo. Os resultados encontrados mostraram que na corda de polipropileno e na corda de náilon não foram observados crescimento de biomassa para colheita, enquanto a corda de algodão ofereceu o melhor resultado, permitindo a produtividade de biomassa aderida de $2,5 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$. GROSS et al. (2013) também apontaram o algodão como o material suporte com boa durabilidade, baixo custo e que permitiu o crescimento aderido da cultura axênica de *Chlorella vulgaris*, perante

a comparação com outros 16 materiais. Os autores ainda avaliaram como a rugosidade poderia interferir na fixação das microalgas. Para isso, quatro diferentes texturas foram comparadas: corda, lenço, jeans e veludo cotelê. A corda de algodão resultou em maior durabilidade e produtividade ($1,08 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

LEE et al. (2014) também avaliaram o crescimento aderido em malha de náilon, malha de aço inoxidável, placa de policarbonato e placa de polietileno, usando água residuária doméstica secundária como meio de cultivo. Os resultados comparativos indicaram as malhas de náilon e de aço inoxidável como melhores suportes para a fixação da biomassa aderida. Os autores optaram pela escolha da malha de náilon para a avaliação de um RB submerso em uma LAT, em escala piloto, uma vez que o baixo custo era um dos critérios usados para seleção do material, e obtiveram resultados de produtividade média de biomassa aderida igual a $9,1 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.

A malha de náilon também foi comparada às malhas de algodão e poliéster em RB plano inclinado (ASSIS et al., 2019), usando água residuária doméstica primária como meio de cultivo. ASSIS et al. (2019) verificaram produtividades de biomassa de $1,57$, $1,80$ e $1,91 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ para as malhas de poliéster, náilon e algodão, respectivamente, sendo que o primeiro material foi o que melhor atendeu as condições de adesão e durabilidade, quando comparado aos demais. Ressalta-se que o RB esteve diretamente em contato com o ar atmosférico e radiação solar. Resultados semelhantes foram encontrados por YU et al. (2020) ao operar um RB plano horizontal. Os autores compararam 10 diferentes materiais suporte, sendo que dois materiais de poliéster apresentaram produtividades de $6,94 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ e $4,80 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. O meio de cultivo consistiu na mistura de água residuária da digestão anaeróbia de resíduos de cozinha diluída em água do mar.

Observa-se por estas investigações que os materiais suportes apresentavam diferentes propriedades como hidrofiliabilidade, porosidade e rugosidade superficial, que podem influenciar na aderência da biomassa. Ainda, na maioria dos estudos que compararam diferentes materiais suportes (LEE et al., 2014; ASSIS et al., 2019, YU et al., 2020), os materiais do tipo malhado (fios entrelaçados) foram os que apresentaram melhores desempenhos de aderência. Isto, pois, as malhas permitem aumentar a rugosidade da superfície do suporte a ser utilizado para a adesão de microalgas (WANG et al., 2018). Entretanto, a forma do reator também pode ser um fator determinante para a escolha do material suporte. O vidro, por exemplo, é um

material que apresenta a superfície lisa e pode ser melhor adaptado aos RBs horizontais, ao passo que no RBs verticais, este material suporte seria um desafio para a adesão das microalgas (ROSLI et al., 2019).

5.7.3. Sistemas híbridos

No âmbito do tratamento de águas residuárias, as LATs são consideradas reatores eficientes para o tratamento de efluentes e a produção de microalgas na forma suspensa, além do baixo custo de operação e manutenção. Contudo, sabe-se que as diversas técnicas de colheita desenvolvidas para biomassa suspensa ainda não são consolidadas. No entanto, substituir esta tecnologia pode não ser economicamente viável, sendo fortemente recomendada que uma adaptação seja realizada nestes reatores de cultivo suspenso (ZHANG et al., 2018a). Nesse sentido, os RBs podem ser conectados a essas unidades, otimizando as etapas de separação, colheita e desidratação, ao passo que as LATs continuam exercendo com eficiência o papel de tratamento das águas residuárias.

Uma vez que os sistemas híbridos combinam dois tipos diferentes de crescimento de biomassa: aderida aos materiais suportes e suspensa no meio de cultivo, a integração de LAT e RBs formam um sistema híbrido de produção de biomassa e tratamento de efluentes (ASSIS et al., 2017). Esta integração surge como uma melhoria das estações de tratamento de águas residuárias existentes (ZHANG et al., 2018a).

Na literatura é possível encontrar resultados positivos da implementação de sistemas híbridos. ZHANG et al. (2018a) cultivaram microalgas em águas residuárias sintéticas com diferentes cargas de nutrientes e relataram valores de produtividade de biomassa na faixa de 10,54 – 14,68 g m⁻² dia⁻¹. Os autores reforçaram a necessidade de estudos em escala piloto, ao ar livre, para avaliar a realidade da remoção de nutrientes e produção de biomassa, bem como seus subprodutos. No estudo de ZHANG et al. (2018b) também em escala laboratorial, as distâncias entre as RBs submersos em LATs foram avaliadas com diferentes águas residuárias sintéticas. A produtividade diminuiu com o aumento da distância, sendo que a distância de 2 cm foi a que apresentou melhor resultado (18,51 g m⁻² dia⁻¹).

Entre os estudos em escala piloto, LEE et al. (2014) avaliaram telas de náilon submersas em uma LAT por 18 dias e relataram uma produtividade máxima de biomassa de 13,5 g m⁻² dia⁻¹, cerca de 4 vezes maior que uma LAT convencional.

GROSS et al. (2013) e GROSS; MASCARENHAS; WEN (2015) avaliaram um sistema híbrido composto por biofilme de algas rotativo adaptado em LATs. Os sistemas híbridos apresentaram maior evaporação de água, devido ao maior contato do RB rotatório com o ar (GROSS; MASCARENHAS; WEN, 2015) e os autores destacaram que os sistemas de cultivos aderidos têm potencial para produzir comercialmente microalgas com alta produtividade e uso eficiente da água.

ASSIS et al. (2017) relataram que a presença de um RB em uma LAT foi capaz de suprir a demanda de CO₂, evitando a suplementação adicional deste gás na otimização do crescimento de microalgas em efluentes. Em outro estudo, ASSIS et al. (2020) avaliaram a integração de RB em uma LAT em comparação à integração de uma LAT convencional e um tanque de sedimentação. Os resultados mostraram que o sistema híbrido alcançou uma produção de biomassa cerca de 2,6 vezes maior que o sistema convencional sem RB, e a eficiência de colheita do sistema híbrido foi de 61% contra 22% obtido com o tanque de sedimentação convencional. Dessa forma, os resultados reportados na literatura, até o momento, confirmam que a tecnologia dos sistemas híbridos é promissora para instalação em uma ETAR.

5.8. Avanços na sustentabilidade econômica e ambiental de crescimento aderido

A produção e diversas rotas de aproveitamento de biomassa algal vem sendo amplamente estudadas. Atrelado a bons resultados técnicos, é essencial buscar caminhos para uma biomassa comercialmente viável e ambientalmente sustentável. Nesse sentido, esforços voltados para a viabilidade técnica e ambiental de biomassa cultivadas em sistemas baseados em biofilme e utilizando águas residuárias como meio de cultivo devem ser incentivados. Não menos importante, a viabilidade social das tecnologias e de rotas de aproveitamento também devem ser alvo de estudo.

A avaliação de sustentabilidade de ciclo de vida pode contribuir nesse sentido. Ela consiste em uma abordagem abrangente que inclui todas as perspectivas dos três pilares da sustentabilidade, combinando métodos de avaliação de custo de ciclo de vida, avaliação ambiental de ciclo de vida e avaliação social de ciclo de vida. As medidas ambientais, econômicas e sociais estão fortemente interligadas (COLLOTTA et al., 2018). Assim, as tomadas de decisões baseadas em todos esses aspectos podem ser mais assertivas e menos negligentes. Estudos abrangente com esse foco ainda são escassos.

Ainda assim, as viabilidades econômica e ambiental vêm sendo estudadas em conjunto ou individualmente, ainda de forma tímida na literatura. Os estudos são realizados, comumente por meio de avaliação técnico-econômica (TEA), para o contexto econômico, e avaliação de ciclo de vida (LCA), para o contexto ambiental. Ao identificarem *hotspots* e estratégias promissoras para superação de limitações das tecnologias (HANDLER et al., 2014), essas metodologias contribuem com direcionamentos para as partes interessadas desenvolverem soluções com baixas pegadas energética e ambiental (SINGH; PATIDAR, 2021), enquanto a tecnologia ainda está em suas fases iniciais de desenvolvimento (DEROSE et al., 2019). O balanço de massa e energia são fundamentais para conduzir ambas as análises mencionadas. Resultados de viabilidade econômica são, comumente, expressos como o preço mínimo de venda de combustível. Os estudos também apresentam resultados discriminados de custos de capital, operacionais e de taxas para melhor compreensão dos resultados. Do ponto de vista ambiental, razão de energia líquida (NER) e o potencial de aquecimento global (expresso pela emissão de CO₂ equivalente) também são comumente calculados (VUPPALADADIYAM et al., 2018). Essas métricas sugerem que os biocombustíveis/bioenergia têm sido um grande foco dos estudos. Na LCA, os impactos ambientais diversos podem ser quantificados em diferentes categorias. Para tanto, existem normas e guias que padronizam e orientam os estudos (ISO 2006; ISO 2009; EC-JRC 2011; GOEDKOOOP et al. 2016; UNEP/SETAC 2016; NIBLICK et al. 2019), assim como há diferentes softwares e metodologias (geralmente relacionadas à um determinado local geográfico) para quantificar os impactos.

Dentre os estudos de viabilidade econômica e desempenho ambiental encontrados na literatura, poucos investigaram ou incluíram no limite de suas fronteiras os sistemas de crescimento aderido. No que diz respeito a integração do tratamento de águas residuárias ao cultivo de biomassa algal, apesar das limitações do crescimento nesse meio de cultivo, muitos trabalhos indicam que a substituição de fertilizantes convencionais oferece contribuições relevantes para a produção de biomassa de microalgas e sugerem o uso de resíduos de outras atividades, como as águas residuárias (HANDLER et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2018). O cultivo em águas residuárias também reduziu impacto de rotas de valorização de biomassa (CASTRO et al., 2020; HANDLER et al., 2014). Estudos indicam que considerar o crédito devido a remoção biológica de nutrientes em águas residuárias, que ocorreria

de forma convencional em uma ETAR, por meio do cultivo de algas é favorável econômica e ambientalmente (BARLOW; SIMS; QUINN, 2016; DEROSE et al., 2019; HANDLER et al., 2014). HANDLER et al. (2014) demonstraram que uma demanda de energia fóssil e emissões de gases de efeito estufa negativos podem ser alcançados ao se converter algas em biocombustível considerando cultivo com efluente de ETAR, desidratação por sedimentação, seguida por pirólise.

Uma vez já elucidado a importância do uso de águas residuárias na perspectiva ambiental e econômica, esta seção irá abordar os principais resultados já encontrados na literatura, em termos econômicos e ambientais, que vem contribuindo para o entendimento do papel dos sistemas de cultivo aderido para a produção e processamento de biomassa microalgal. SINGH; PATIDAR (2020) ao estudar TEA e LCA destacaram que as etapas de cultivo e colheita podem afetar significativamente o custo de produção e os impactos ambientais durante a produção de biocombustíveis e bioprodutos de algas. Resultados encontrados na literatura, apresentados nas Seções seguintes (5.8.1 e 5.8.2), reforçam essa afirmação e levantam outros pontos interessantes intrínsecos do cultivo em RBs.

5.8.1. Análises econômicas

Os elevados custos de capital e operacionais relacionados ao cultivo e processamento da biomassa precisam ser superados para promover a produção comercial de microalgas (MORALES; BONNEFOND; BERNARD, 2020). Mesmo que a biomassa seja cultivada em águas residuárias, ainda haverá custos para o cultivo e processamento da biomassa, que podem e devem ser investigados analisando diferentes arranjos de produção e tecnologias de modo a otimizar os melhores modelos de negócio. Além disso, para os RBs o material suporte representa uma questão crítica para sua aplicação comercial (MORALES; BONNEFOND; BERNARD, 2020), sendo desejável materiais duráveis, baratos e leves (LIU et al., 2013).

Os custos da produção de biomassa cultivada em um reator ATS, utilizando como meio de cultivo água de uma vala de drenagem agrícola, foram determinados por KANGAS; MULBRY (2014). Diferentes cenários (em termos de fonte de energia, tempo de operação do reator, tempo de depreciação dos custos de capital) foram avaliados. Os autores consideraram resultados de um reator operado em condições reais que resultaram em uma produção diária de 75 kg de sólidos secos por hectare

e remoções diárias de N e P de 1,5 kg ha⁻¹ e 0,16 kg ha⁻¹, respectivamente. Assim, considerando uma operação de 270 dias ao ano e cronograma de reembolso de 20 anos para custos de capital, utilizando eletricidade, os custos por kg de sólidos secos, por kg de N e de P seriam de \$ 1,80, \$ 90,00 e \$ 850,00, respectivamente. Os custos anuais totais para operar seriam de \$36.700,00. Semelhantemente, considerando o uso de energia solar, os custos por kg de sólidos secos, por kg de N e de P seriam de \$ 1,80, \$ 90,00 e \$ 830,00, respectivamente, com custos anuais totais de operação de \$ 35.700,00. Segundo os autores, os valores sofrem influência da assimilação de nutrientes (que resulta em maiores ou menores produtividades), assim, maiores taxas de remoção de nutrientes ou uso de meio de cultivo mais rico poderia resultar em resultados ainda mais favoráveis.

Os estudos de viabilidade econômica dos processos de microalgas para biocombustíveis têm apresentadas grandes variabilidades devido às incertezas no custo de produção de biomassa (HOFFMAN et al., 2017). Nesse sentido, HOFFMAN et al. (2017) identificaram a oportunidade de comparar, por meio de TEA, o reator ATS com sistema de lagoa, uma vez que, segundo os autores, a maioria dos estudos se voltaram para lagoas de alta taxa ou FBRs fechados. Para o ATS, o cultivo considerou uso de águas residuárias e a colheita foi realizada com um raspador montado em trator. Enquanto para a lagoa foi considerado cultivo com adição de nutrientes (carbono, N e P) e a colheita foi realizada por meio de decantação, floculação com quitosana e flotação por ar dissolvido, seguida por centrifugação. Os custos da biomassa cultivada na lagoa e no ATS foram de \$ 673 tonelada⁻¹ e \$ 510 tonelada⁻¹. Os principais contribuintes para os custos operacionais da lagoa foram os requisitos de energia, nutrientes e desidratação, enquanto para o ATS, foram o custo de energia para bombear o meio de cultivo para o reator, seguidos pelo combustível da colheita e mão-de-obra. Os custos de capital dos dois sistemas foram próximos. A análise realizada pelos autores indicou que a produtividade e a estabilidade da cultura foram sensíveis para determinar a viabilidade econômica.

Os resultados de OZKAN et al. (2012) reforçam os benefícios energéticos obtidos ao evitar a etapa de desidratação da biomassa. Os autores demonstraram que a biomassa composta por *Botryococcus braunii* (LB 572), cultivada em meio sintético, foi 275, 35 e 95 vezes mais concentrada quando comparada com biomassas colhidas em lagoa, FBR placa plana e FBR tubular descritas em JORQUERA et al. (2010). No entanto, mesmo com produtividade menor, o sistema de cultivo de biofilme ofereceria

NER mais favorável comparado à uma lagoa (com produtividade 13 vezes maior) (OZKAN et al., 2012).

DEROSE et al. (2019) conduziram uma TEA e LCA (resultados do LCA são apresentados na Seção 5.2) para avaliar o processamento, em larga escala, de biomassa de algas colhida em um reator ATS. Foram considerados processamentos bioquímicos (fermentação de proteínas e carboidratos para produzir produtos de álcool fúsel, seguido por liquefação hidrotérmica para produzir um biocrude) e termoquímico (apenas liquefação hidrotérmica de algas para biocrude). A biomassa possuía baixo teor de lipídios (5% de peso seco livre de cinzas) e alto teor de cinzas (75% do peso seco). Foram estimados custos de capital e operacionais e, por meio de um modelo de taxa de retorno de fluxo de caixa descontado, o preço mínimo de venda de combustível (MFSP) relativo ao preço necessário para vender um galão de gasolina equivalente (GEE^{-1}). Considerando o contexto de biorrefinaria, para a via bioquímica foi incluída a venda de energia por meio dos álcoois, bio-crude e nafta, além de co-produto de estruvita, enquanto para a via termoquímica considerou-se apenas o bio-crude e a nafta. Os MFSPs encontrados foram de \$ 12,85 e \$ 10,41 GGE^{-1} para as vias bioquímicas e termoquímicas, respectivamente. Segundo os autores, o principal gargalo foi o alto teor de cinzas, que eleva o custo da matéria-prima em ambas as rotas. Esse fator aumenta consideravelmente os custos de capital, devido ao aumento no dimensionamento de equipamentos, além dos custos operacionais, uma vez que há maior consumo de energia para bombeamento e mistura, aquecimento e resfriamento (DEROSE et al., 2019). Dessa forma, o estudo conclui que, apesar do sistema ATS se mostrar uma alternativa para produção de alga de baixo custo, esforços ainda são necessários para tornar o biocombustível produzido a partir de algas cultivados nesse reator mais competitivo. A inclusão de créditos de remediação de água ou receita de tratamento de águas residuárias no estudo trouxe benefício, embora pequeno (DEROSE et al., 2019).

Esses resultados corroboram com os obtidos em BARLOW; SIMS; QUINN (2016) ao investigar a viabilidade econômica de uma biorrefinaria (incluindo a liquefação hidrotérmica e um RB rotacional acoplado em uma lagoa) a base de biofilme de algas. Os autores identificaram que a inclusão de créditos econômicos associados ao deslocamento de custos operacionais e de capital do tratamento de águas residuárias poderia reduzir o MFSP do *biocrude* de \$ 47,38 gal^{-1} para \$ 45,70 gal^{-1} , respectivamente e, deslocando custos de capital teríamos \$ 40,60 gal^{-1} . O custo

da matéria-prima foi identificado como um ponto influente no MFSP. De acordo com a análise de sensibilidade, os autores concluíram que a produtividade de biomassa deve ser otimizada pois afetou significativamente o preço de venda de combustível, comportamento não observado para a energia para a separação da biomassa (BARLOW; SIMS; QUINN, 2016).

O elevado teor de cinza é característico desse sistema de cultivo, devido a sua tendência de abrigar diatomáceas e dos sólidos suspensos das águas residuárias utilizadas como meio de cultivo (DEROSE et al., 2019). Comumente, biomassa cultivadas em águas residuárias apresentam alto teor de cinzas. Os valores encontrados na literatura, considerando diferentes design de reatores, materiais suportes e meio de cultivo, são de 16,5 – 75% de peso seco (BARLOW; SIMS; QUINN, 2016; CHOUDHARY et al., 2017; ASSIS et al., 2017; DEROSE et al., 2019). Dada à grande variação e dependência de outros fatores relacionados ao tipo de efluente e pré-tratamento adotado, os resultados de TEA podem ser diferentes em cada contexto, uma vez que estudos já demonstraram que o teor de cinzas é um parâmetro sensível para viabilidade econômica (BARLOW; SIMS; QUINN, 2016). As cinzas podem ser biogênicas (constituindo a biomassa) ou não (adsorvida nas células dos microrganismos), dessa forma, algumas estratégias podem ser adotadas visando a remoção desses compostos não desejáveis. Por exemplo, cita-se a remoção prévia dos sólidos do meio de cultivo (por exemplo, por meio de filtros), inóculo ou pré-tratamento da própria biomassa (para o caso das cinzas biogênicas) (DEROSE et al., 2019). Segundo a análise de sensibilidade realizada por DEROSE et al. (2019), a redução do conteúdo de cinzas em 50% refletiu na redução dos MFSP em 32,30% e 31,51% para as vias bioquímica e termoquímica, respectivamente.

5.8.2. Análises de impacto ambiental

Os impactos ambientais de um sistema híbrido, composto por uma LAT conectada a um RB, voltado para a produção de biomassa integrado ao tratamento de esgoto doméstico foram quantificados por MAGALHÃES et al. (2021). O material suporte utilizado para fixação e crescimento da biomassa (cultura mista composta por espécies nativas e que se adaptaram ao meio de cultivo) foi o algodão. Os impactos ambientais foram quantificados com o uso do software SimaPro e a metodologia ReCiPe *Midpoint* (H). Os autores encontraram valores negativos de impactos

ambientais totais (ou seja, benefícios ambientais) da operação do sistema para produção de 1 kg de biomassa nas seguintes categorias investigadas: *Global Warming, Ozone Depletion, Terrestrial, Acidification, Freshwater Eutrophication, Marine Eutrophication, Ozone Formation, Particulate Matter Formation, Metal Depletion, Fossil Depletion, Human Toxicity and Terrestrial Ecotoxicity*. Para as categorias *Freshwater and Marine Eutrophication* e *Human non-carcinogenic toxicity* os benefícios foram negativos, sendo que para as duas primeiras os impactos negativos foram associados às emissões para a água de nutrientes (N e P) considerando a eficiência de tratamento obtida pelo sistema no caso de o esgoto doméstico tratado ser lançado direto em um corpo receptor. Para a categoria *Human non-carcinogenic toxicity*, a produção do algodão superou os benefícios ambientais dos produtos evitados, além do seu uso estar associado à aplicação de inseticidas na produção agrícola. Para superar os impactos das emissões de nutrientes, o esgoto doméstico tratado a nível secundário poderia receber um pós-tratamento terciário ou ser destinado, por exemplo, para reuso agrícola.

Apesar de apresentar um bom desempenho ambiental, os autores destacaram que os impactos do uso de algodão tiveram contribuições relevantes, considerando todas as entradas, produtos evitados e emissões modelados nesse cenário. Dessa forma, sugeriram que estudos futuros avaliem no âmbito da sustentabilidade ambiental diferentes materiais suportes para o crescimento da biomassa. Além disso, eles apontaram que o aumento da fronteira do sistema, incluindo a etapa de colheita, poderia resultar em melhores resultados para o sistema híbrido (MAGALHÃES et al., 2021).

As etapas de cultivo e colheita desse mesmo sistema híbrido foram investigadas por FERREIRA et al. (2020). As autoras compararam, por meio de LCA, três métodos de colheita de uma biomassa de cultura mista (espécies nativas que se desenvolveram no meio de cultura) cultivada em esgoto doméstico pré-tratado por tanque séptico, sendo eles: sedimentação gravitacional de biomassa suspensa (cenário 1); floculação com tanino seguida de sedimentação gravitacional de biomassa suspensa (cenário 2) e sedimentação gravitacional de biomassa suspensa somado a raspagem manual de um reator plano de biofilme (cenário 3). O reator de cultivo dos cenários 1 e 2 foi uma LAT, enquanto o cenário 3 foi considerado o sistema híbrido. Além disso, nesse estudo o poliéster foi utilizado como material suporte do reator de biofilme. Utilizou-se o software SimaPro e a metodologia ReCiPe *Midpoint*

(H), sendo que os impactos ambientais foram mensurados em suas dezoito categorias (*Climate change, Ozone depletion, Terrestrial acidification, Freshwater eutrophication, Marine eutrophication, Human toxicity, Photochemical oxidant formation, Particulate matter formation, Terrestrial ecotoxicity, Ionizing radiation, Agricultural land occupation, Natural land transformation, Water depletion, Metal depletion e Fossil depletion*).

O cenário 3, do sistema híbrido, apresentou rendimento de biomassa por consumo energético de 5 e 3,4 vezes maior quando comparado aos cenários 1 e 2, respectivamente. Ou seja, ele contribuiu com que maior quantidade de biomassa fosse colhida com um menor consumo energético. Com relação aos impactos ambientais, o cenário 1 mostrou-se mais impactante em todas as categorias analisadas, seguido pelo cenário 3 e, posteriormente, o cenário 2. Apesar da coagulação com o tanino ter se mostrado menos impactante, dentre todos os métodos utilizados, o RB apresenta a vantagem de oferecer uma biomassa com menor teor de umidade (94% contra 99% da biomassa colhida com tanino), o que pode reduzir o consumo energético nas etapas de desidratação/secagem da biomassa, dependendo das exigências de umidade da rota de valorização desejada (FERREIRA et al., 2020).

Dentre todas as categorias de impacto avaliadas, a etapa de colheita, considerando o sistema híbrido, teve maior contribuição nos impactos ambientais na categoria de *Fossil depletion* (60%). Os *inputs* desse processo eram a energia (assumido como o mix energético brasileiro, que conta com aproximadamente 80% de energia hidroelétrica) necessária para recirculação do esgoto doméstico no RB e o poliéster utilizado como material suporte. O consumo energético foi o que mais contribuiu para os impactos ambientais em todas as categorias. A maior contribuição do poliéster foi na categoria *Fossil depletion* (42% do impacto) devido ao uso de recursos não renováveis, como os hidrocarbonetos, em sua fabricação. O uso de energia para raspagem do RB não foi considerado no estudo, em vista disso, os autores sugeriram que estudos futuros deveriam incluir esse fator no modelo para tecnologias de maior escala.

Diferentes estudos foram conduzidos para quantificar emissões de CO₂, balanço energéticos e impactos ambientais de biocombustíveis e biorrefinarias. DEROSE et al. (2019), mencionado anteriormente na Seção 5.1, demonstrou um potencial de aquecimento global de 111,2 e - 2 g CO_{2eq} (MJ combustível)⁻¹ para rotas bioquímica (produção de *biocrude*, nafta, álcool fúsel e estruvita) e termoquímica

(produção de *biocrude* e nafta). As maiores emissões associadas à via bioquímica ocorreram porque, ao agregar mais etapas de processamento da biomassa, maior consumo de gás natural foi necessário para secar o excesso de produção de algas (responsável por 128,7 g CO_{2eq} MJ combustível⁻¹) e, em menor proporção, ao consumo de eletricidade para aquecimento do reator de liquefação hidrotérmica (DEROSE et al., 2019). Reduzir 50% das cinzas resultaria em emissões de 53,81 g CO_{2eq} MJ combustível⁻¹ e -32,6 g CO_{2eq} MJ combustível⁻¹ para as vias bioquímicas e termoquímicas, respectivamente (DEROSE et al., 2019).

BARLOW; SIMS; QUINN (2016) também estudaram o tratamento termoquímico por meio de liquefação hidrotérmica para produção de um biocombustível. Contudo, eles consideraram um reator giratório de biofilme de microalgas (acoplado a uma lagoa), enquanto DEROSE et al. (2019) considerou a produção em ATS. O tratamento de águas residuárias foi considerado e o modelo também incluiu as etapas de colheita mecânica (por um sistema de lâmina estacionária), purificação e refino para diesel renovável, transporte e distribuição dos produtos. Os resultados foram expressos em termos de NER (sendo valores menores mais favoráveis) e potencial de aquecimento global para 1 MJ de produto combustível entregue à bomba comercial. Os valores de NER e emissões de gases de efeito estufa, considerando a produtividade de 20 g de peso seco livre de cinzas m⁻² dia⁻¹ e rendimento de *biocrude* de 30% (com base na massa seca livre de cinzas), foram de 0,81 e -2,7 g CO_{2eq} MJ⁻¹, respectivamente. A etapa de cultivo foi quem mais contribuiu para o consumo de energia e emissão de CO₂. Isso ocorreu devido a operação do motor de acionamento do reator rotacional de biofilme de algas, enquanto a colheita mecânica e bombeamento da pasta de biomassa apresentam consumo e emissões insignificantes BARLOW; SIMS; QUINN (2016). A otimização do modelo, por meio do aumento da produtividade para 30 g de peso seco livre de cinzas m⁻² dia⁻¹, rendimento de *biocrude* de 42% (com base na massa seca livre de cinzas) e redução pela metade do ciclo de trabalho do reator, resultou em NER de 0,33 e -43,6 g CO_{2eq} MJ⁻¹, contudo, não foi possível superar o NER do diesel convencional (0,19) (BARLOW; SIMS; QUINN, 2016). Ressalta-se, entretanto, que os autores não consideraram as emissões da combustão de combustível no estudo que, segundo eles, iria resultar, para o modelo otimizado, em emissões de 30,4 g CO_{2eq} MJ⁻¹.

Em sistemas de crescimento aderido sob a forma biofilme são necessários equipamentos estruturais adicionais, por exemplo o material suporte, e isso pode afetar

a avaliação global (MORALES; BONNEFOND; BERNARD, 2020). Mais uma vez, os benefícios de uma colheita simples (por raspagem) de uma biomassa pronta para uso (com teor de umidade entre 80 – 90%) é destacado na literatura. Os sistemas de cultivo suspenso e cultivo aderido também foram comparados em termos ambientais no estudo de MORALES; BONNEFOND; BERNARD (2020) que comparou um reator giratório de biofilme, acoplado a uma lagoa (chamado de RAB *modified raceway*), e uma lagoa operada sozinha, sob as mesmas condições meteorológicas. O estudo foi conduzido considerando cultivo sintético (uso de fertilizantes convencionais, água doce e água do mar) para a produção em larga escala de *Tetraselmis suecica* (microalga verde marinha). No cenário do RAB *modified raceway*, a biomassa era colhida com um teor de 20% de sólidos (com base no peso seco) através de um *scraper blade*. Por outro lado, a biomassa suspensa (na lagoa) requereu concentração, que no modelo, ocorreu por meio da combinação das técnicas de decantação, filtração membranas e centrifugação. Para a produção de 1 kg de biomassa de microalgas a 20% (peso seco), considerando que ambos os sistemas tenham a mesma produtividade ($20 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), a necessidade de energia foi 16,7% maior para a lagoa quando comparada ao RAB *modified raceway* (MORALES; BONNEFOND; BERNARD, 2020). Contudo, como se espera que a produtividade de biomassa seja maior do RAB *modified raceway*, acredita-se que ele seja favorável para a produção de biomassa (MORALES; BONNEFOND; BERNARD, 2020).

5.9. Conclusões

Os sistemas de crescimento aderidos têm se mostrado promissores para produção de biomassa. Apesar de existirem muitos fatores que interferem no seu crescimento e esse campo de pesquisa ainda ser novo, seu desempenho no tratamento de águas residuárias tem sido satisfatório. Em termos econômicos e ambientais, os relatos da literatura apontam que o alto teor de cinza é um gargalo para um bom desempenho nessas esferas, contudo, os sistemas de crescimento aderido têm se mostrado menos impactante do que outras tecnologias de cultivo e/ou colheita. Considerar o cultivo de microalgas no contexto do tratamento de águas residuárias já trouxe avanços, nesse sentido, contudo, sua performance ambiental e econômico precisa receber maior atenção entre os pesquisadores.

5.10. Referências

- ASSEMANY, P. P. et al. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. **Algal Research**, v. 17, p. 53–60, 2016.
- ASSIS, L. R. et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. January, p. 101440, 2019.
- ASSIS, L. et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. April, p. 111183, 2020.
- ASSIS, L. R. et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.
- BARLOW, J.; SIMS, R. C.; QUINN, J. C. Techno-economic and life-cycle assessment of an attached growth algal biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 360–368, 2016.
- BARRANGUET C. Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technical challenge. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 34, p 1-9, 2004.
- BERNER, F.; HEIMANN, K.; SHEEHAN, M. Microalgal biofilms for biomass production. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1793–1804, 2015.
- BLANKEN, W. et al. Optimizing carbon dioxide utilization for microalgae biofilm cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 769–776, 2017.
- BOELEE, N. C. et al. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Research*, v. 45, n. 18, p. 5925–5933, 15 Nov. 2011.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020.
- CHOUDHARY, P. et al. Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 276–284, 2017.

CHRISTENSON, L. B.; SIMS, R. C. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1674–1684, 2012.

COLLOTTA, M. et al. Wastewater and waste CO₂ for sustainable biofuels from microalgae. **Algal Research**, v. 29, n. November 2016, p. 12–21, 2018.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMAN, P. Biomass production in high rate ponds and hydrothermal liquefaction: Wastewater treatment and bioenergy integration. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020.

COUTO, E. et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, 2015.

DEROSE, K. et al. Integrated techno economic and life cycle assessment of the conversion of high productivity, low lipid algae to renewable fuels. **Algal Research**, v. 38, n. July 2018, p. 101412, 2019.

DI PIPPO, F. et al. Diversity and biomass accumulation in cultured phototrophic biofilms. **European Journal of Phycology**, v. 49:3, p. 384-394, 2014.

EC-JRC (Commission of the European Union. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability). International reference life cycle data system (ILCD) handbook: general guide for life cycle assessment: provisions and action steps. 2011.

FERREIRA, A. et al. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 1316–1327, 2017.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FLEMMING, H. C. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H. C. et al. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 7, 10, p. 1-5, 2021.

GOEDKOOOP, M. et al. **Introduction to LCA with SimaPro**, 2016.

HANDLER, R. M. et al. Life cycle assessment of algal biofuels: Influence of feedstock cultivation systems and conversion platforms. **Algal Research**, v. 4, n. 1, p. 105–115, 2014.

HOFFMAN, J. et al. Techno-economic assessment of open microalgae production systems. **Algal Research**, v. 23, p. 51–57, 2017.

HUANG, Y. et al. Comparison of *Chlorella vulgaris* biomass productivity cultivated in biofilm and suspension from the aspect of light transmission and microalgae affinity to carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 367–373, 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14044:2009 Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines**. [s.l: s.n.].

ISO. **Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines**, 2006.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 24, p. 403–415, 2017.

GROSS, M. et al. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 195–201, 2013.

GROSS, M.; JARBOE, D.; WEN, Z. Biofilm-based algal cultivation systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 14, p. 5781–5789, 2015.

HOH, D.; WATSON, S.; KAN, E. Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 466–473, 2016.

IRVING, T. E.; ALLEN, D. G. Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 283–294, 2011.

JOHNSON, M.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 525-534, 2010.

JORQUERA, O. et al. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1406–1413, 2010.

KHAN, S. et al. Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment. **Fuel**, v. 311, p. 122543, 2022.

KANGAS, P.; MULBRY, W. Nutrient removal from agricultural drainage water using algal turf scrubbers and solar power. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 484–489, 2014.

KATARZYNA, L.; SAI, G.; AVIJEET SINGH, O. Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: Literature review and research needs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1418–1427, 2015.

KESAANO, M.; SIMS, R. C. Algal biofilm based technology for wastewater treatment. **Algal Research**, v. 5, n. 1, p. 231–240, 2014.

LEE, S.-H. et al. Higher Biomass Productivity of Microalgae in an Attached Growth System, Using Wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1566–1573, 2014.

LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, n. June, p. 121934, 2019.

LIU, J. et al. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1127–1137, 2017.

LIU, T. et al. Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 216–222, 2013.

LORENTZ, J. F. et al. Microalgal biomass as a biofertilizer for pasture cultivation: Plant productivity and chemical composition. **Journal of Cleaner Production**, v. 276, p. 124130, 2020.

MAGALHÃES, I. B. et al. Technologies for improving microalgae biomass production coupled to effluent treatment: A life cycle approach. **Algal Research**, v. 57, n. March, 2021.

KATARZYNA, L.; SAI, G.; AVIJEET SINGH, O. Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: Literature review and research needs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1418–1427, 2015.

MANTZOROU, A. et al. Microalgae: a potential tool for remediating aquatic environments from toxic metals. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 8, p. 1815–1830, 2018.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 3187–3201, 2019.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MATHIMANI, T. et al. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: Process evaluation and knowledge gaps. **Journal of Cleaner Production**, v. 208, p. 1053–1064, 2019.

MENDONÇA, H. et al. Microalgae in a global world: New solutions for old problems? **Renewable Energy**, v. 165, p. 842–862, 2021.

MORALES, M.; BONNEFOND, H.; BERNARD, O. Rotating algal biofilm versus planktonic cultivation: LCA perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 257, p. 120547, 2020.

NAGARAJAN, D. et al. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. **Bioresource Technology**, v. 302, n. January, p. 122817, 2020.

NIBLICK, B.; STATES, U.; PROTECTION, E. **Global Guidance on Environmental Life Cycle Impact Assessment Indicators**, v. 2, n. December, 2019.

OZKAN, A. et al. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 542–548, 2012.

OZKAN, A.; BERBEROGLU, H. Cell to substratum and cell to cell interactions of microalgae. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 302–309, 2013.

PAQUETTE, A. J. et al. Dynamic changes in community composition of *Scenedesmus*-

seeded artificial, engineered microalgal biofilms. **Algal Research**, v. 46, n. January, 2020.

POSADAS, E. et al. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 50–58, 2013.

POSADAS, E. et al. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239–248, 2015.

ROESELERS, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MUYZER, G. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 3, p. 578–585, 2007.

ROSLI, S. S. et al. Modeling to enhance attached microalgal biomass growth onto fluidized beds packed in nutrients-rich wastewater whilst simultaneously biofixing CO₂ into lipid for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 185, n. January, p. 1–10, 2019.

ROSLI, S. S. et al. Optimum interaction of light intensity and CO₂ concentration in bioremediating N-rich real wastewater via assimilation into attached microalgal biomass as the feedstock for biodiesel production. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 141, p. 355–365, 2020.

ROY, M.; MOHANTY, K. A comprehensive review on microalgal harvesting strategies: Current status and future prospects. **Algal Research**, v. 44, n. October, p. 101683, 2019.

SCHNEIDER, R. DE C. DE S. et al. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture media. **Algal Research**, v. 32, n. April, p. 280–292, 2018.

SCHNURR, P. J.; ALLEN, D. G. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 418–429, 2015.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. **Bioresource Technology**,

v. 136, p. 337–344, 2013.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. The effect of light direction and suspended cell concentrations on algal biofilm growth rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8553–8562, 2014.

SEBESTYÉN, P. et al. Upscale of a laboratory rotating disk biofilm reactor and evaluation of its performance over a half-year operation period in outdoor conditions. **Algal Research**, v. 18, p. 266–272, 2016.

SEKAR, R. et al. Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. **Freshwater Biology**, v. 47, p. 1893–1907, 2002.

SHEN, Y. et al. Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 3, p. 441–450, 2014.

SHEN, Y. et al. Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 481–488, 2015.

SIBONI, N. et al. Conditioning and initial biofilm formation on ceramics tiles in the marine environment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 274, Ed. 1, p. 24–29, 2007.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 499–508, 2018.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Development and Applications of Attached Growth System for Microalgae Biomass Production. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 3, p. 709–722, 2021.

STAUCH-WHITE, K. The role of inorganic nitrogen in successful formation of granular biofilms for wastewater treatment that support cyanobacteria and bacteria. **AMB Express**, v. 7:146, 2017.

SUTHERLAND, D. L.; CRAGGS, R. J. Utilising periphytic algae as nutrient removal systems for the treatment of diffuse nutrient pollution in waterways. **Algal Research**, v. 25, p. 496–506, 1 Jul. 2017.

SUTHERLAND, D. L. et al. Improved microalgal productivity and nutrient removal through operating wastewater high rate algal ponds in series. **Algal Research**, v. 47, n. February, p. 101850, 2020.

TANGO, M. D. et al. Microalgae cultivation in agro-industrial effluents for biodiesel application: Effects of the availability of nutrients. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 57–68, 2018.

THOBIE, C. Different types of bubbly flows in a confined channel with the aim of limiting microalgae biofilm development – Part II: Study of the development and removal of microalgae biofilm. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 175, 108899, 2022.

TONINELLI, A. E. et al. Scenedesmus dimorphus biofilm: Photoefficiency and biomass production under intermittent lighting. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 1–10, 2016.

TORRES-FRANCO, A. et al. Current advances in microalgae-based treatment of high-strength wastewaters: challenges and opportunities to enhance wastewater treatment performance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 209–235, 2021.

TSOLCHA, O. N. et al. Agroindustrial wastewater treatment with simultaneous biodiesel production in attached growth systems using a mixed microbial culture. **Water (Switzerland)**, v. 10, n. 11, p. 1–25, 2018.

UNEP/SETAC. Global Guidance for Life Cycle Impact Assessment Indicators Volume 1. v. 1, p. 166, 2016.

VUPPALADADIYAM, A. K. et al. Sustainability Analysis of Microalgae Production Systems: A Review on Resource with Unexploited High-Value Reserves. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 14031–14049, 2018.

WANG, J. H. et al. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. April, p. 331–342, 2018.

WANG, J.; LIU, W.; LIU, T. Biofilm based attached cultivation technology for microalgal biorefineries—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1245–1253, 2017.

WANG, Y. et al. Attachment and antibiotic response of early-stage biofilms studied using resonant hyperspectral imaging. **Biofilms and Microbiomes**, v. 6, 2020.

YU, Z. et al. Inclined algal biofilm photobioreactor (IABPBR) for cost-effective cultivation of lipid-rich microalgae and treatment of seawater-diluted anaerobically

digested effluent from kitchen waste with the aid of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123761, 2020.

YUAN, H. et al. Effect of light spectra on microalgal biofilm: Cell growth, photosynthetic property, and main organic composition. **Renewable Energy**, v. 157, p. 83–89, 2020.

XIAO, R., ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, p. 1225–1244, 2016.

ZAMALLOA, C.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Decentralized two-stage sewage treatment by chemical–biological flocculation combined with microalgae biofilm for nutrient immobilization in a roof installed parallel plate reactor. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 152–160, 2013.

ZHANG, B. et al. Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 118, n. March 2019, p. 109563, 2020.

ZHANG, H.; ZHANG, X. Microalgal harvesting using foam flotation: A critical review. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 176–188, 2019.

ZHANG, J. et al. Feasibility of partial-denitrification/ anammox for pharmaceutical wastewater treatment in a hybrid biofilm reactor. **Water Research**, v. 208, 117856, 2022.

ZHANG, Q. et al. Operation of a vertical algal biofilm enhanced raceway pond for nutrient removal and microalgae-based byproducts production under different wastewater loadings. **Bioresource Technology**, v. 253, p. 323–332, 2018a.

ZHANG, Q. et al. Vertical-algal-biofilm enhanced raceway pond for cost-effective wastewater treatment and value-added products production. **Water Research**, v. 139, p. 144–157, 2018b.

ZHAO, Y. et al. Insights into biofilm carriers for biological wastewater treatment processes: Current state-of-the-art, challenges, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 288, n. April, p. 121619, 2019.

ZHUANG, J-L. et al. The anammox coupled partial-denitrification process in an integrated granular sludge and fixed-biofilm reactor developed for mainstream wastewater treatment: Performance and community structure. **Water Research**, v.

210, 117964, 2022.

ZHUANG, L. L. et al. The characteristics and influencing factors of the attached microalgae cultivation: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 94, n. November 2017, p. 1110–1119, 2018.

ZHUANG, L. L.; LI, M.; HAO NGO, H. Non-suspended microalgae cultivation for wastewater refinery and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 308, n. February, p. 123320, 2020.

ZOU, X. et al. A novel microalgal biofilm reactor using walnut shell as substratum for microalgae biofilm cultivation and lipid accumulation. **Renewable Energy**, v. 175, p. 676–685, 1 Sep. 2021.

6. CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO DE BIOFILME MICROALGAL-BACTERIANO APLICADO AO TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO: AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE NITROGÊNIO E COMUNIDADE DE MICROALGAS

Resumo

Os sistemas de cultivo de microalgas baseado em biofilme têm atraído atenção por superarem desafios nas etapas de cultivo e, principalmente, de colheita, quando comparado ao cultivo suspenso. Baseado em suas vantagens e na importância de recuperar nutrientes, como o nitrogênio (N), o objetivo deste estudo foi de avaliar as variações do conteúdo de N e da abundância de espécies de microalgas durante a formação do biofilme, bem como realizar um balanço de massa de N para compreender o papel do biofilme para sua recuperação. Reatores de biofilmes foram operados, sob condições ambientais, em regime semi-contínuo e alimentados com esgoto doméstico. Variáveis de produção de biomassa e de tratamento do esgoto foram monitoradas. O biofilme atingiu produção máxima de 55,7 (5,9) g sólidos voláteis totais m^{-2} e 0,9 (0,1) g clorofila-a m^{-2} , em 32 dias de operação, crescendo em taxas de 1,7 (0,2) g sólidos voláteis totais m^{-2} e 0,03 (0,003) g clorofila-a m^{-2} . No reator de biofilme, uma taxa de aplicação superficial de 4,1 g NT $m^{-2} \text{ dia}^{-1}$ foi aplicada, o que resultou em uma recuperação N, contido no biofilme, de 181,1 mg N $m^{-2} \text{ dia}^{-1}$ (4,2% do N que entrou no sistema). Como a operação ocorreu em altos valores de pH do meio de cultivo (>10), os processos físico-químicos foram os principais responsáveis pela remoção de nutrientes, embora não contribuam para as suas recuperações. O conteúdo de N no biofilme apresentou as mesmas tendências observadas para a produção de clorofila-a e densidade e abundância das espécies e foram mensurados 62,9 (7,9) mg g biofilme $^{-1}$ e 5796,0 (546,5) mg N m^{-2} assimilados no biofilme final. Estratégias para aprimorar a recuperação de N no biofilme devem ser encorajadas, especialmente, porque o crescimento aderido oferece vantagens técnicas e ambientais para a etapa de colheita, o que pode contribuir para sua aplicação em larga escala em estações de tratamento de águas residuárias.

Palavras-chave: Reator de biofilme. Crescimento aderido. Tratamento de águas residuárias. Balanço de massa. Sucessão de microalgas.

6.1. Introdução

As microalgas são organismos fotossintetizante amplamente estudados. Sua biomassa pode ser valorada por meio de diversas rotas para produção de *hydrochar* (CASTRO et al., 2021), suplementação e ração e animal (NICCOLAI et al., 2019; YADAV et al., 2020), biofertilizantes e (CASTRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2021), bioenergias (FERREIRA et al., 2017; MIYAWAKI et al., 2021). Quando cultivadas em águas residuárias, ainda contribuem para biorremediação, bem como para recuperação de recursos, o que pode promover em avanços para a (bio)economia circular.

Dentre os desafios que ainda precisam ser superados para produção de microalgas em larga escala estão as dificuldades da etapa de colheita, que, comumente, é associada a altos custos e demanda energética (QUIJANO; ARCILA; BUITRÓN, 2017). O aprimoramento da etapa de cultivo também tem sido largamente estudado, a fim de alcançar maiores produtividades. Pesquisadores vêm se dedicando a estratégias que busquem aumentar a produtividade dos reatores pela otimização de parâmetros técnicos, suplementação de CO₂ (ASSIS et al., 2017, ASSIS et al., 2019), recirculação da biomassa sedimentada para a lagoa (PARK; CRAGGS; SHILTON, 2015) e por meio do desenvolvimento de reatores com designs diferentes, como os sistemas híbridos (ASSIS et al., 2017; NARALA et al., 2016; ASSIS et al., 2020).

Nas últimas décadas, os sistemas de cultivo aderido baseados em biofilme têm atraído interesse científico por oferecerem significativas vantagens tanto na etapa de cultivo, quanto para colheita (ASSIS et al., 2020). Os benefícios de acoplar o crescimento aderido ao suspenso já foi demonstrado em termos de produtividade de biomassa (LEE et al., 2014; LIN-LAN; JING-HAN; HONG-YING, 2018; ASSIS et al., 2020) e lipídica (TAO et al., 2017), eficiência de colheita (FERREIRA et al., 2020; ASSIS et al., 2020) e suplementação de CO₂ (ASSIS et al., 2017). Dentre as vantagens do crescimento aderido, estão: (i) tornar as etapas de colheita e desaguamento mais fáceis e baratas; (ii) alta densidade celular (iii) maior resistência a estresses e toxicidades, e (iv) colheita com menor consumo energético (ZHUANG; LI; NGO, 2020).

Fatores que afetam o desenvolvimento do biofilme vêm sendo explorados a fim de otimizar esses reatores. Estudos voltados para compreensão de parâmetros de crescimento como efeitos da intensidade luminosa, perfil e transporte de CO₂ e O₂,

atividade fotossintética, bem como aplicação de diferentes fontes e cargas de nutrientes no biofilme já foram desenvolvidos (BLANKEN et al., 2017; BOELEE et al., 2011; ROSLI et al., 2019; YUAN et al., 2020). Além disso, houve expressivos esforços para avaliar os efeitos de diferentes tipos de materiais suporte na produção de biomassa e lipídica no biofilme (SCHNURR; ALLEN, 2015). Apesar dos avanços relatados na literatura, ainda existem lacunas a respeito de muitos fatores que influenciam na formação do biofilme e na operação de seus reatores, que ainda precisam ser devidamente esclarecidos (SINGH; PATIDAR, 2021).

O padrão de crescimento do biofilme é caracterizado pelas tendências de remoção de nutrientes (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Apesar das altas eficiências de remoção de N nos reatores de biofilmes (RBs) serem reportadas (CHOUDHARY et al., 2017; ASSIS et al., 2017; POSADAS et al., 2013), o papel do biofilme para recuperação desse nutriente ainda pode ser mais explorado. Desse modo, o presente estudo se propõe a compreender quais as oportunidades para recuperação de N por meio do biofilme. Como a biomassa aderida pode ser facilmente colhida e em maiores eficiências de recuperação de sólidos quando comparado a outros métodos convencionais e ao cultivo suspenso (FERREIRA et al., 2020), concentrar um significativo teor de N no biofilme é interessante.

A otimização da carga de aplicação superficial de N para o tratamento terciário (BOELEE et al., 2011) e os efeitos de sua concentração e forma sobre a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) nos RBs foram investigados. Há relatos de altas eficiências de remoção de N em águas residuárias sintéticas e reais, mas ainda existem poucos estudos que elaboraram um balanço de massa de N, como no estudo de BOELEE et al. (2014a). Além disso, os efeitos das condições ambientais reais e mecanismos de remoção de N do tratamento de águas podem ser mais bem explorados.

Existe uma grande biodiversidade em biofilmes cultivados em águas residuárias, que são compostos por algas, bactérias, fungos, dentre outros organismos. Neles, importantes interrelações na microbiota acontecem, que influenciam o crescimento do biofilme e a remoção de poluentes do meio de cultivo. Dessa forma, a composição de espécies é um fator importante para a performance dos RBs, afetando a sua estabilidade em longo prazo e a produção eficiente de biomassa (PAQUETTE et al., 2020). O desenvolvimento do biofilme é diferente e

depende das espécies que o compõe (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Por isso, a abundância das espécies também foi alvo de investigação.

O presente estudo acompanhou o crescimento de um biofilme microalgal-bacteriano com o objetivo de (i) avaliar a recuperação de N pela biomassa aderida, (ii) realizar um balanço de massa de N e (iii) compreender mudanças da comunidade de microalgas. Paralelamente, as eficiências do tratamento de poluentes do esgoto doméstico, bem como a produtividade do biofilme foram investigadas e discutidas. O diferencial do estudo foi monitorar, durante a formação do biofilme, a variação do conteúdo de N do biofilme cultivado em condições ambientais. Os resultados foram relacionados as espécies de microalgas presentes no biofilme.

6.2. Materiais e Métodos

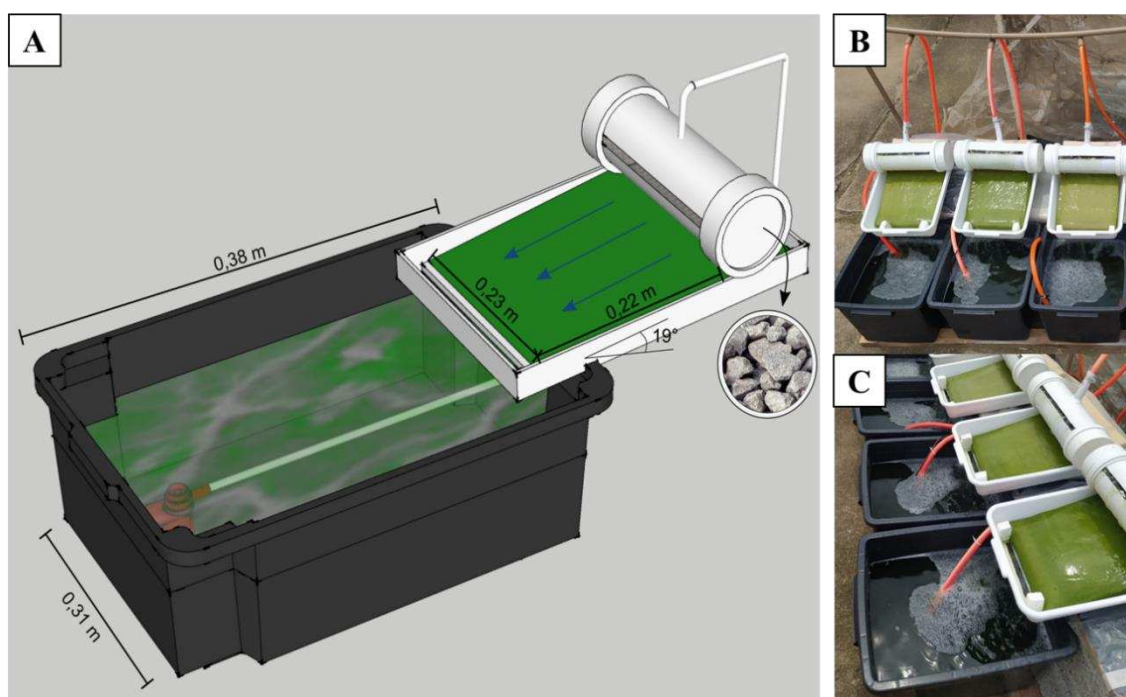
6.2.1. *Design* do reator de biofilme

A unidade experimental do presente estudo foi baseada nos RBs utilizados por ASSIS et al. (2019). O RB foi confeccionado com um material suporte composto por uma placa de poliestireno (que ofereceu sustentação) revestido por tecido poliéster (Sk têxtil, oxford, 100% poliéster). O tecido poliéster foi adotado como material para aderência e desenvolvimento do biofilme baseado nos resultados de sua performance relatados na literatura (ASSIS et al., 2019; XU et al., 2017; YU et al., 2020). O material suporte possuía 0,39 m de comprimento total, 0,23 m de largura total (área total = 0,0897 m²) e comprimento útil de 0,22 m (área útil = 0,0506 m²). O RB foi apoiado em um suporte confeccionado em tubos de PVC (diâmetro = 10 cm, comprimento = 31 cm, abertura longitudinal = 21 x 1 cm) e em uma bandeja (39 x 26 x 7 cm, Plasútil) e ficou inclinado em 19° em relação a horizontal. A bandeja possuía uma abertura longitudinal de 15,7 cm² no centro inferior, no qual o meio de cultivo foi drenado por gravidade para uma caixa plástica (0,38 m de comprimento, 0,31 m de largura, área superficial = 0,118 m² e volume útil = 18 L), que o armazenava.

O meio de cultivo foi recirculado da caixa plástica para o material suporte com auxílio de uma bomba subaquática (Sarlobetter, modelo S520), de vazão nominal de 520 L h⁻¹, e distribuído por meio de um conjunto de mangueiras e pelo tubo de PVC, que foi preenchido com brita nº 1 a fim de uniformizar o fluxo ao longo do reator. As bombas ficavam localizadas dentro da caixa plástica. O volume de trabalho adotado para o meio de cultivo foi de 18 L e, baseado em SHEN et al. (2016), as perdas por

evaporação foram compensadas, diariamente, por adição de água destilada, de modo a manter sempre o mesmo volume de trabalho. A Figura 6.1 apresenta um esquema (com destaque para as dimensões da caixa plástica que comporta o meio de cultivo e da área disponível para o crescimento aderido) dos RBs e fotografias do segundo dia de operação.

Figura 6.1 – (a) Diagrama esquemático e (b) e (c) imagens dos reatores de biofilme no segundo dia de operação.



Os RBs foram instalados em local com iluminação natural direta (condições *outdoor*) e ficaram orientados para o norte para garantir a incidência de radiação solar direta. Durante os eventos de chuva, os RBs foram cobertos com plástico, que reduzia a radiação fotossinteticamente ativa (RAF) em cerca de 30%, a fim de evitar o carreamento da biomassa e a diluição do meio de cultivo.

6.2.2. Meio de cultivo e inóculo

Utilizou-se esgoto doméstico como meio de cultivo, que foi coletado em uma estação descentralizada de tratamento de águas residuárias, em escala real, após tratamentos preliminar e primário (em desarenador e tanque séptico). Além disso, foi adicionado inóculo (10% do volume útil), que foi preparado previamente em *Erlenmeyer* com a mesma água residuária sob condições ambientais. A caracterização do inóculo foi: sólidos suspensos totais = $1,66 \text{ g L}^{-1}$; sólidos suspensos voláteis = $1,51 \text{ g L}^{-1}$ e clorofila-a = $9,65 \text{ mg L}^{-1}$.

6.2.3. Operação do reator de biofilme

O experimento foi realizado na área experimental localizada na parte externa do Laboratório de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (20°45'14''S e 42°52'54''O). O município de Viçosa possui clima tropical de altitude, com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos (COUTO et al., 2015).

O experimento ocorreu entre outubro e novembro de 2021, período que corresponde à primavera. Três RBs foram operados, sob as mesmas condições, durante 32 dias em regime semi-contínuo, com vazão de projeto de 3 L dia⁻¹ e tempo de detenção hidráulica de 6 dias. Ao longo do experimento, houve monitoramento diário (entre 11h40 e 12h40) das condições do meio de cultivo, são elas pH, temperatura, concentração e saturação do oxigênio dissolvido (OD), com auxílio de sonda multiparâmetro (Hach, modelo HQ40d), e da RFA no local com radiômetro (LICOR, LI-1500). Além disso, foram obtidos dados da radiação ao longo do dia durante o experimento (INMET, 2022) (Apêndice B). As vazões de recirculação foram mantidas entre 288 – 302 L h⁻¹ e foram reguladas manualmente. As bombas subaquáticas responsáveis pelo meio de cultivo operaram durante 12 horas por dia (6h às 18h) para que, dessa forma, os RBs ficassem em contato constante com o meio de cultivo durante o dia e, pela noite, em contato com o ar.

6.2.4. Procedimentos analíticos

6.2.4.1. Caracterização do esgoto doméstico

O esgoto doméstico foi caracterizado antes e após o tratamento para monitorar as principais variáveis de qualidade da água do meio de cultivo e as suas respectivas eficiências de remoção. As análises de demanda química de oxigênio solúvel (DQOs, método 5220 D), nitrogênio total *Kjeldahl* (NTK, método 4500-Norg C), nitrogênio amoniacal total (N-NH₄⁺, método 4500-NH₃ C), nitrato (NO₃⁻, método 4500-NO₃⁻ A), fósforo solúvel (Ps, método 4500-P C) foram realizadas em laboratório seguindo as especificações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA-AWWA-WEF, 2012). A amônia livre foi determinada conforme equação apresentada por COUTO et al. (2015). As análises foram realizadas no 1º, 10º, 20º e 32º dias de operação. As variáveis relacionadas ao conteúdo de N também

foram quantificadas no 15^o e 30^o dias de operação a fim de determinar as suas taxas de remoção.

6.2.4.2. Caracterização do biofilme

6.2.4.2.1. Produção de biomassa

A produção de biomassa total e de microalgas foi mensurada, ao longo da formação do biofilme, de forma indireta por meio da quantificação de sólidos voláteis totais (SVT) e clorofila-*a*, respectivamente. As análises foram realizadas após ser observado biofilme passível de raspagem para obtenção de amostras. Os SVT foram medidos conforme APHA-AWWA-WEF (método 2540 E, 2012). Para determinar clorofila-*a*, as amostras foram diluídas previamente em água destilada e, após, realizou-se a técnica de extração com etanol 80% a quente, com leitura realizada em espectrofotômetro e cálculos usando as equações descritas por SCHWARZBOLD et al. (2013), adaptada de MARKER et al. (1980) e SARTORY; GROBBELAAR (1984) (Eq. 6.1).

$$\text{Clorofila} - a \text{ (ug.cm}^{-2}\text{)} = \frac{(Eb-Ea) \times \left(\frac{R}{R-1}\right) \times k \times w}{S \times L} \quad \text{Eq. 6.1}$$

Em que, E_b é absorvância do extrato a 665 nm menos a absorvância a 750 nm, antes da acidificação, E_a é absorvância do extrato a 665 nm menos a absorvância a 750 nm, depois da acidificação, $R = 1,72$ (razão de rendimento da clorofila-*a* não acidificada, conforme WETZEL; LIKENS (2000)), $R/(R-1) = 2,39$, $k = 27,9$ (coeficiente de absorção da clorofila-*a* para 80% etanol), V é o volume do solvente utilizado (mL), L é comprimento do caminho óptico através da cubeta (1 cm) e S é a área total de biofilme raspado por amostra (cm²).

Para ambas as análises e em cada RB foram coletadas amostras compostas obtidas por meio da raspagem de quatro diferentes áreas de 1,0 cm² do biofilme. As raspagens foram realizadas com o auxílio de uma espátula e ocorreram nos dias 17, 20, 25, 30 e 32, que ocorreram em locais alternados para garantir com que a coleta anterior não comprometesse a seguinte, uma vez que a biomassa aderida cresce cumulativamente. Esse cuidado para coleta de biomassa foi tomado para realização dessas análises os demais apresentados nas Seções 6.2.4.2.2 e 6.2.5. As análises foram realizadas em duplicata para cada reator.

6.2.4.2.2. Comunidade de microalgas e taxa específica de crescimento

As comunidades de microalgas do biofilme, do inóculo e do meio de cultivo no final da operação foram caracterizadas em nível de gênero e, para os gêneros dominantes, as espécies presentes foram identificadas. Análise quantitativa foi realizada, onde os indivíduos foram contados em câmara de sedimentação sob microscópio invertido, conforme o método de UTHERMÖL (1958). A densidade dos organismos foi determinada usando os critérios descritos em APHA-AWWA-WEF (2012). Para a análise qualitativa, a identificação foi realizada em microscópio invertido, conforme PARRA et al. (1982) e KOMAREK; FOTT (1983). Amostras compostas foram obtidas, para cada reator, por meio da raspagem de 0,5 cm² - 1 cm² em quatro pontos diferentes do biofilme. Com intuito de determinar a mudança da composição de espécies e sua sucessão ecológica ao longo da formação do biofilme, as amostras de biomassa aderida foram obtidas nos dias 17^o, 20^o, 25^o e 32^o dias de operação. Cada amostra foi diluída em 20 mL de água destilada e conservada com 4% formol (acréscimo de 10% do volume útil) a 4^o C até que as análises fossem realizadas. Além disso, a taxa específica de crescimento foi calculada com base nos valores de densidade de organismos, conforme a Eq. 6.2.

$$\mu = \frac{(\ln X_i - \ln X_0)}{t_i - t_0} \quad \text{Eq. 6.2}$$

Em que, μ é a taxa de crescimento específica (d⁻¹), X_i é a densidade de organismos (organismo m⁻²) no tempo t_i (dia) e X_0 é a densidade de organismos (organismo m⁻²) no tempo t_0 (dia).

6.2.4.2.3. Composição bioquímica

Ao final do experimento, toda a biomassa presente no RB foi raspada. A biomassa foi seca em estufa a 105 °C e macerada. Uma única amostra composta de biomassa foi obtida para os biofilmes dos três reatores e foi caracterizada em termos de carboidratos, lipídeos, proteínas, cinzas e umidade. O conteúdo de carboidratos foi mensurado a partir do método de hidrólise ácida quantitativa da biomassa (HOEBLER et al., 1989), seguido pelo método do reagente fenol-sulfúrico (DUBOIS et al.; 1956) e lido em espectrofotômetro (490 nm), usando curva padrão de glicose. O conteúdo de proteína foi determinado, indiretamente, através do N total mensurado no método de NTK (APHA, método 4500-Norg C) e o fator de conversão de N para proteína de 6,25 (ZHONG et al., 2012). O conteúdo de lipídeos foi determinado usando o método de extração Soxhlet (AOAC, 2000), onde os lipídeos neutros e de membrana foram

discriminados. Os lipídeos neutros foram extraídos no determinador de gordura (Tecnal TE-044-8/50) por seis horas, utilizando o hexano 99% como solvente. Após, os lipídios de membranas foram extraídos com etanol 96% por três horas. Os lipídeos neutros e de membranas foram quantificados por gravimetria. Por fim, para determinar o teor de umidade e cinzas, a biomassa aderida foi submetida a secagem em estufa a 105°C até atingir massa constante (EN 14771-1:2009) e combustão em mufla a 550°C durante 3 horas (EN 14775:2009) e as quantificações se deram pela diferença de peso antes e após cada etapa.

6.2.4. Balanço de massa de nitrogênio

O N está presente nas águas residuárias em diferentes formas e existem vários mecanismos para sua remoção, seja por processos físico-químicos ou biológicos. No presente estudo, atenção especial foi dada para o tratamento de N e um balanço de massa foi realizado. Conforme COUTO et al. (2015), o balanço de N total pode ser realizado, considerando que a carga de N que entrou nos reatores é equivalente a carga efluente, somado ao N consumido nos processos de desnitrificação, volatilização e sedimentação. Assim, no presente estudo, o balanço foi realizado por meio a Eq. 6.3 (adaptada de COUTO et al., 2015), que também considera o N presente no biofilme.

$$N_{den} = Q \times NT_{in} - \left[(Q \times NT_{out}) + N_{vol} + N_{sed} + \left(\frac{N_{biofilme} \times S}{T_{op}} \right) \right] \quad \text{Eq. 6.3}$$

Em que, N_{den} é o nitrogênio desnitrificado (mg d^{-1}), Q é a vazão (L d^{-1}), NT_{in} é a concentração inicial de nitrogênio total (mg L^{-1}), NT_{out} é a concentração final de nitrogênio total (mg L^{-1}), N_{vol} é a carga de nitrogênio volatilizado (mg d^{-1}), N_{sed} é a carga de nitrogênio sedimentado (mg d^{-1}), $N_{biofilme}$ é a concentração de nitrogênio no biofilme no 32º dia de operação (mg m^{-2}), S é a área superficial útil do RB (m^{-2}) e T_{op} é o tempo de operação (d).

Os valores de N total do esgoto doméstico antes e após o tratamento foram mensurados e representam a soma dos valores de NTK e nitrato. As análises para sua quantificação foram descritas na Seção 6.2.4.1. O conteúdo de N no biofilme foi determinado pelo método de *Kjeldahl* com amostras úmidas de 0,5 – 1,0 cm^2 , que foram coletadas de quatro pontos diferentes do reator. Utilizou-se a fórmula para determinar N de amostra de lodo adaptada de APHA-WEF-AWWA (2012), na qual o

peso da biomassa seca do biofilme foi obtido por meio dos valores de sólidos totais (Equação 6.4). O conteúdo de sólidos totais foi mensurado segundo APHA-AWWA-WEF (método 2540 E, 2012) e procedimentos de coletas foram descritas anteriormente (Seção 5.2.4.2.1). Além disso, o N também foi quantificado por área (mg N cm^{-2}).

$$\frac{\text{mg N}}{L} = \frac{(A-B) \times 280}{ST \times S} \quad \text{Eq. 6.4}$$

Em que, A é o volume de H_2SO_4 titulado por amostra (mL), B é o volume de H_2SO_4 titulado para o branco (mL), ST é a produção de massa de sólidos totais por área (g m^{-2}) e S é a área raspada para a determinação dos sólidos totais (m^{-2}).

COUTO et al. (2015) fizeram um balanço de N do tratamento de esgoto doméstico em lagoas de alta taxa e, segundo os autores, como nesse reator ocorre mistura constante do meio de cultivo, pode-se considerar que não ocorreu sedimentação de nitrogênio. Contudo, nos RB aqui estudados, apesar de ocorrer uma recirculação do meio de cultivo, ocorre sedimentação na caixa plástica que armazena o esgoto doméstico. Assim, os valores de N desnitrificado, volatilizado e sedimentado foram calculados, dentro de uma única variável (Equação 6.5).

$$N_{\text{desn+sed+vol}} = V \times NT_{\text{in}} - [V \times NT_{\text{out}} + (N_{\text{biofilme}} \times S)] \quad \text{Eq. 6.5}$$

Em que, $N_{\text{den+sed+vol}}$ é a massa de desnitrificado, sedimentado e volatilizado (mg), NT_{in} é a concentração inicial de nitrogênio total (mg), NT_{out} é a concentração final de nitrogênio total (mg), V é o volume do meio de cultivo (L), N_{biofilme} é o nitrogênio presente no biofilme (mg m^{-2}) e S é a área superficial útil do RB (m^{-2}).

Os resultados foram apresentados discriminando em (i) N orgânico, (ii) N-NH_4^+ , (iii) NO_3^- , todos antes e após o tratamento do esgoto doméstico, bem como (iv) N desnitrificado, volatilizado e sedimentado e o N mensurado no biofilme. O N orgânico mensurado para o esgoto tratado equivale ao N orgânico do esgoto doméstico que não foi removido do líquido e aquele que foi assimilado pela biomassa suspensa.

6.2.5. Análise estatística

O experimento foi realizado com triplicatas experimentais de forma independente. Os resultados foram apresentados como valores médios e desvio padrão, sendo que, para as figuras, o desvio padrão foi apresentado por barra de erro.

6.3. Resultados e discussão

6.3.1. Condições ambientais e tratamento de esgoto doméstico

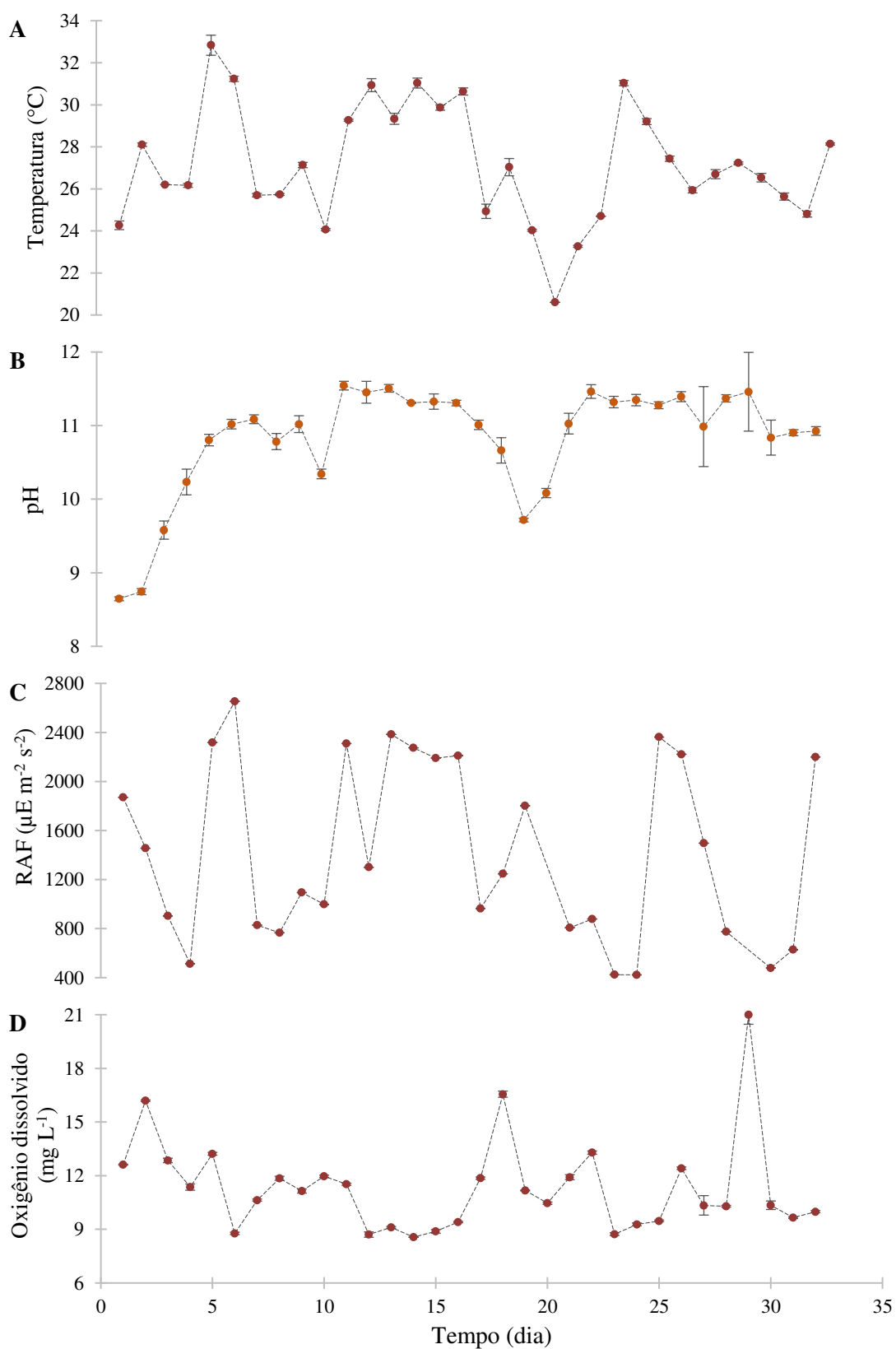
O desempenho do tratamento em sistemas de microalgas é fortemente influenciado pelas características das águas residuárias e condições ambientais (KUBE et al., 2018). Fatores ambientais, como radiação solar, temperatura e condições do meio de cultivo, como pH e OD, influenciam no desenvolvimento e produtividade primária do biofilme (LIU et al., 2017). A temperatura afeta o equilíbrio iônico (consequentemente o pH), a solubilidade de gases, como O₂ e CO₂ e as taxas metabólicas de microalgas e bactérias (LU et al., 2020). Além disso, temperaturas mais altas são responsáveis por encurtar a fase lag, afetando os estágios iniciais de formação do biofilme (DI PIPPO et al., 2014). Temperaturas média, máxima e mínima de 27,18; 32,83 e 20,60 °C foram observadas, respectivamente, no meio de cultivo (Figura 6.2a). Ao longo da operação, ocorreram flutuações de cerca de 6°C de um dia para o outro. Os biofilmes são mais sensíveis as flutuações de temperatura quando comparado ao crescimento suspenso, uma vez que ele está em contato com um volume menor de água, que tem papel tampão na temperatura (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Ainda assim, todos os valores registrados de temperatura se encontram dentro da faixa ideal para o crescimento de microalgas que, apesar de variar por espécie, normalmente, é de 10 a 35 °C (LIU et al., 2017).

O valor médio do pH medido do esgoto doméstico utilizado para alimentar os RBs foi de 7,59 (Tabela 6.1) e o pH do meio de cultivo inicialmente foi de 8,65 (Figura 6.2b). Ao longo da operação seu valor médio foi de 10,83, chegando a um valor máximo de 11,54. Na maior parte da operação, o pH se manteve acima 10. Esses valores sugerem a ocorrência de intensa atividade fotossintética, ocorrendo limitação de carbono inorgânico para o desenvolvimento algal. Como não houve suplementação de CO₂, os valores de pH se mantiveram altos.

A RFA (Figura 6.2c) média medida no local foi de 1425,8 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ e a maioria dos valores registrados se mantiveram acima de 800 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$. Essa variável influencia o crescimento da biomassa, favorecendo a atividade fotossintética (ASSIS

et al., 2020). Os valores da RFA justificam as altas temperaturas do meio de cultivo, bem como reforça a ocorrência de intensa atividade fotossintética. Além disso, a irradiância é um fator que promove a síntese de EPS (DI PIPPO et al., 2014), que são essenciais para o espessamento e amadurecimento do biofilme.

Figura 6.2 – Valores de (a) temperatura, (b) pH, (c) PAR e (d) oxigênio dissolvido do meio de cultivo ao longo da operação (n=3, barras verticais representam o desvio padrão).



A atividade fotossintética da comunidade microalgal ocorre durante o período iluminado, resultando na produção líquida de O_2 (KUBE et al., 2018). No primeiro dia de operação, o OD do meio de cultivo foi de $8,85 \text{ mg L}^{-1}$. Ainda que os reatores tenham sido alimentados com esgoto doméstico com valores mais baixos de OD (Tabela 6.1), a presença de microalgas adicionadas pelo inóculo e que se desenvolveram durante a operação, resultou no incremento de OD, atingindo concentração média e máxima de $11,36$ e $21,00 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Existem várias vias de remoção de poluentes no biofilme microalgal-bacteriano, como absorção de nutrientes inorgânicos, nitrificação e desnitrificação, volatilização de amônia, oxidação anaeróbica de amônio, bem como adsorção de materiais orgânicos e inorgânicos (LIU et al., 2017). A Tabela 6.1 resume os valores das variáveis de qualidade de água do esgoto doméstico (médias e desvio padrão), utilizado como meio de cultivo, e do efluente tratado nos reatores durante os 32 dias de operação. A eficiência de remoção de DQO foi de 19,0%, enquanto para Ps, NKT, $N-NH_4^+$ foram de 81,5%, 75,8% e 99,4%, respectivamente. Isso releva o potencial do reator para remoção de nutrientes, por outro lado, um processo anterior é necessário para alcançar menores concentrações de matéria orgânica.

Os valores de OD foram superiores a 3 mg L^{-1} , indicando que não houve limitação do requisito de O_2 para degradação aeróbica da matéria orgânica e, até mesmo, para nitrificação (POSADAS et al., 2013). Ainda assim, a eficiência de remoção de DQOs foi baixa. Resultado mais promissor foi encontrado por CHOUDHARY et al. (2017), que relataram eficiência de remoção de DQOs de 80% de chorume digerido anaerobiamente (concentração de DQOs = 2200 mg L^{-1}) em RB com pH constante igual a 7.

Ainda assim, não são esperadas altas taxas de remoção de matéria orgânica de águas residuárias caracterizadas com altas cargas desse poluente em sistemas baseados em microalgas, quando comparado a outras tecnologias convencionais (como lodos ativados), pois sua performance é voltada para o polimento. Similarmente ao que foi discutido para lagoas de alta taxa, os RBs devem ser entendidos como um processo unitário inserido em sistema completo de tratamento de águas residuárias (COUTO; CALIJURI; ASSEMAN, 2020). Além disso, em sistemas híbridos avaliados em escala piloto, foi relatado que a adição de BR não contribuiu para o aumento da remoção de DQO, logo, sua remoção se deu na lagoa de alta taxa (ASSIS et al., 2020).

Tabela 6.1 – Caracterização de variáveis de qualidade e eficiência de tratamento do esgoto doméstico.

Variável	Esgoto doméstico	Reator de biofilme	Eficiência de remoção (%)
pH	7,6 (0,3)	-	-
OD (mg L ⁻¹)	3,2 (0,8)	-	-
DQOs (mg L ⁻¹)	378,8 (79,0)	306,6 (16,1)	19,0
Ps (mg L ⁻¹)	8,4 (1,1)	1,5 (0,3)	81,5
NTK (mg L ⁻¹)	67,6 (5,2)	16,3 (3,1)	75,8
N-NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)	62,8 (5,8)	0,4 (0,3)	99,4
N-NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	0,9 (1,1)	10,2 (3,6)	-

Nota: valores médios e desvio padrão em parênteses, n = 3. OD = oxigênio dissolvido; DQOs = demanda química de oxigênio solúvel; Ps = fósforo solúvel; NTK = Nitrogênio total *Kjeldahl*; N-NH₄⁺ = nitrogênio amoniacal total; N-NO₃⁻ = nitrato.

Por outro lado, o potencial do RBs na remoção de nutrientes é evidente. POSADAS et al. (2013) compararam os desempenhos de biofilmes bacteriano e microalgal-bacteriano durante o tratamento de esgoto doméstico, utilizando espuma de PVC como material suporte, condições artificiais de luz (88 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para o biofilme microalgal-bacteriano) e pH mantido próximo da neutralidade. Os autores observaram eficiências de remoções de carbono próximos (>80%) para ambos os tratamentos, contudo, o biofilme microalgal-bacteriano ofereceu maior remoção de nutrientes, no qual houve remoção duas vezes mais alta de N total e, para o fósforo, não houve remoção no biofilme bacteriano.

O pH também influencia o equilíbrio de compostos químicos presentes no meio de cultivo (ASSIS et al., 2020). Como o pH atingiu valores acima de 9, a volatilização de N-NH₄⁺ e precipitação de P foi favorecida. Durante todo o experimento, o percentual de amônia livre se manteve acima de 99,9% e, desse modo, estava passível de volatilização. Esses processos físico-químicos garantem a remoção desses nutrientes do meio líquido, contudo, sua recuperação via assimilação da biomassa é reduzida. No presente estudo, acredita-se que esses tenham sido os principais mecanismos de remoção de nutrientes. Apesar disso, como foi observada presença de biomassa aderida no RB e suspensa no meio de cultivo, a assimilação desses nutrientes também ocorreu. Por fim, o monitoramento de NO₃⁻ revelou um

acréscimo de NO_3^- (948,4%) no esgoto doméstico tratado, o que indica que parte do N foi nitrificado pelas bactérias. Apesar do NO_3^- ser uma fonte de N para as microalgas, na presença de N-NH_4^+ , as microalgas absorvem preferencialmente essa forma de N devido a menor quantidade de energia requerida para sua assimilação (NAGARAJAN et al., 2020).

As eficiências de remoção de nutrientes aqui apresentadas são próximos aquelas reportadas na literatura para sistemas que incluem o crescimento aderido de microalgas aplicado ao tratamento de águas residuárias. ASSIS et al. (2019) avaliaram o tratamento de esgoto doméstico em RBs com diferentes materiais suportes (algodão, poliéster e náilon) em condições climáticas próximas a do presente estudo e encontraram altas eficiências de remoção de N-NH_4^+ superiores a 90% e Ps superiores a 70%. Para o poliéster, ocorreu maior nitrificação (incremento de 41% contra 12% do algodão e 9% do náilon), o que foi associado, pelos autores, com o desenvolvimento de bactérias nitrificantes, cuja morfologia filamentosa contribuiu para formação do biofilme. Eficiências de remoção de DQOs (70 – 98%), Ps (88 – 93%), N-NH_4^+ (93 – 98%) e N-NO_3^- (93 - 100) foram reportadas no tratamento de águas cinzas, águas residuárias de bovinocultura e chorume digerido anaerobiamente (CHOUDHARY et al., 2017).

Para sistemas compostos por RBs verticais submersos em lagoas de alta taxa foram obtidas eficiências de remoção acima de 73,68% para o N total e 89,85% para o fósforo total de efluentes sintéticos (ZHANG et al., 2018a). ASSIS et al. (2020) operaram um sistema híbrido composto por lagoa de alta taxa acoplada a um RB vertical com recirculação do meio de cultivo de 10h dia^{-1} . Os autores observaram que a assimilação de nutrientes da biomassa foi o principal responsável pelas remoções de fósforo total (16,2%) e N-NH_4^+ (77,3%), uma eficiência de remoção de DQO total de 58,8% e incremento de N-NO_3^- de cerca de 3800%.

Apesar das eficiências promissoras reportadas na literatura, POSADAS et al. (2013) destacaram eficiências de remoção em RB alimentado com esgoto doméstico de 91% e 70% para carbono e nitrogênio, respectivamente, sendo que apenas 50% e 36% foram recuperados no biofilme microalgal-bacteriano. Para o fósforo o resultado foi mais promissor, uma vez que ocorreu remoção de $85 \pm 9\%$ e recuperação no biofilme colhido de $85 \pm 13\%$. No presente estudo, a assimilação de Ps no biofilme não foi avaliada, ou seja, não foi possível estimar a participação do biofilme em sua

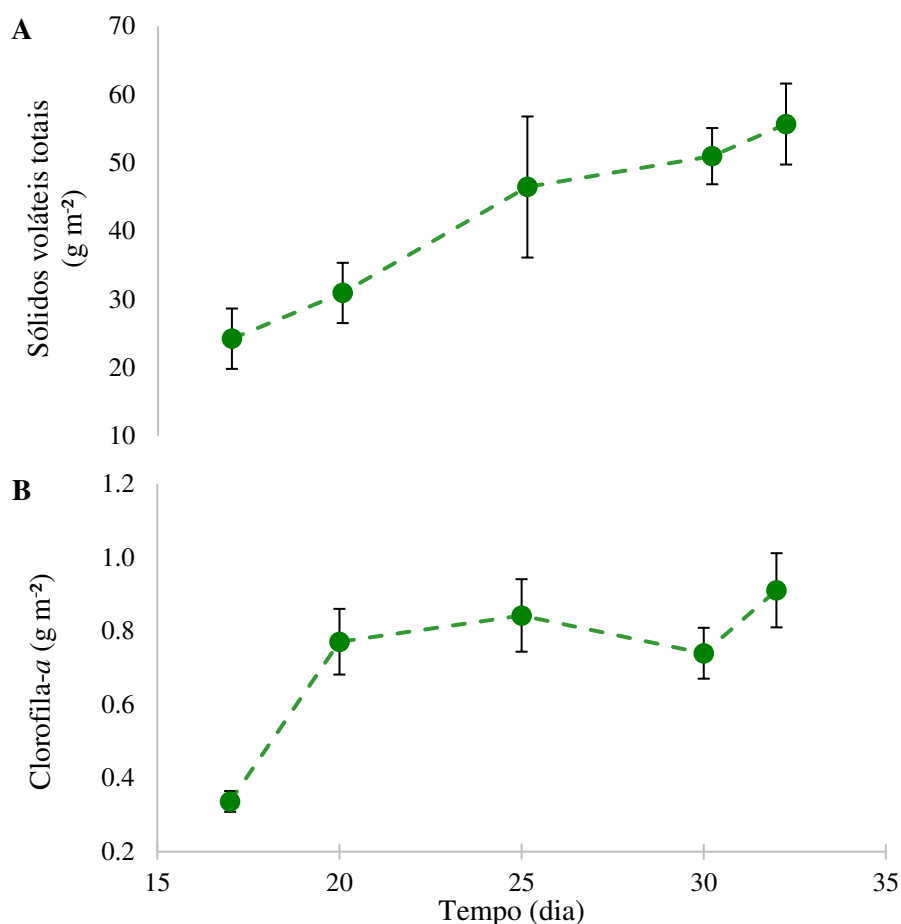
remoção. A Seção 6.3.3 abordará o balanço de N e discutirá melhor os mecanismos para sua remoção, bem como o papel do biofilme para sua recuperação.

6.3.2. Crescimento de biomassa suspensa e aderida

A adesão inicial de biomassa no RB foi observada desde o primeiro dia de operação. O espessamento do biofilme foi acompanhado e, após 17 dias, observou-se uma camada espessa de biofilme, que poderia ser raspada sem comprometer a sua integridade, permitindo a realização de todas as análises sem interferir no monitoramento posterior. É possível um aumento nas concentrações de STV e clorofila-a nesse período (Figura 6.3a e b). Para os STV observou-se um crescimento maior entre 17 – 25 dias, enquanto para clorofila-a ocorreu um aumento entre os dias 17 e 20, seguido de concentrações mais estáveis e, após, um pico do crescimento (32º dia).

A relação N:Ps (baseado em N total) do esgoto doméstico variou em uma faixa de 6:1 – 12:1 ao longo do experimento. Como foi utilizada água residuária real, a variabilidade da sua composição, refletida nas concentrações afluentes de nutrientes, é comumente encontrada em estações de tratamento, o que justifica a variação na relação N:P. Essa proporção é próxima ao valor médio ideal para microalgas de água doce de 12:1 (HEALEY, 1973, DUBOC et al., 1999, AHLGREN et al., 1992). BOELEE et al. (2011) encontraram razão molar N:P de capacidade máxima de absorção de 14:1 ao avaliar os efeitos de diferentes cargas de nitrato e fosfato no crescimento de biofilme.

Figura 6.3 – Monitoramento de (a) sólidos totais voláteis e (b) clorofila-a ao longo da formação do biofilme (n=3, barras verticais representam o desvio padrão).



Os parâmetros de produção de biomassa foram 24,2 (4,4) g STV m⁻² e 0,3 (0,03) g clorofila-a m⁻², no dia 17, e de 55,7 (5,9) g STV m⁻² e 0,9 (0,1) g clorofila-a m⁻² ao final do experimento (Figuras 6.3a e 6.3b). Os valores de produtividades aqui reportados foram comparados com outros da literatura (Tabela 6.2). Apesar da assimilação de nutrientes não ter sido o principal mecanismo de remoção dos nutrientes, a produtividade de STV foram próximas às observadas por POSADAS et al. (2013) e ASSIS et al (2019) (quando o poliéster foi utilizado como material suporte). Por outro lado, foram menores daquelas relatadas por ASSIS et al. (2020), que reportaram menores valores de pH e predominância da assimilação das algas na remoção de nutrientes (CHOUDHARY et al., 2017; ASSIS et al; 2017; ASSIS et al., 2020). Ressalta-se que os estudos apresentados na Tabela 6.2 foram realizados sob diferentes condições de cultivo e configurações de reator, bem como diferentes métodos de quantificação de biomassa.

Tabela 6.2 – Produtividade de biomassa, remoção e recuperação de N em RBs encontrados na literatura e neste estudo.

Biorreator/ Material suporte	Meio de cultivo/ Concentração de N e P	Carga NT (g m ⁻² dia ⁻¹)	Produtividade (g m ⁻² dia ⁻¹)	N removido (%)	N no biofilme (mg/g biofilme)	Referência
Retor vertical Tecido geotêxtil de polietileno	Água residuária municipal 5 mg N/L e 0,5 - 1 mg P/L		2,7 – 4,5	6 – 28%	55	(BOELEE et al., 2014b)
Reator vertical Tecido geotêxtil de polietileno	Água residuária sintética 10 mg NO ₃ ⁻ L ⁻¹ e 1,1 mg PO ₄ ⁻³ L ⁻¹	0,8	2,7 – 7,2	-	~ 77	BOELEE et al. (2014a)
Reator vertical acoplado a uma lagoa de alta taxa Algodão	Esgoto doméstico 37,3 N-NH ₄ ⁺ mg/L, 1,6 NO ₃ ⁻ mg/L e 5,2 Ps mg/L	7,46 ^a e 16 ^b	5,87 - 9,99 ^c	79 – 84% ^d	40 – 49 ^c	ASSIS et al. (2017)
Reator vertical acoplado a uma lagoa de alta taxa Tecido poliéster	Esgoto doméstico 87,4 N-NH ₄ ⁺ mg/L, 1,1 NO ₃ ⁻ mg/L e Ps mg/L	17,48 ^a e 0,22 ^b	0,08 (clorofila- <i>a</i>) ^c 29,83 (SVT) ^c	77,3 ^d	ND	ASSIS et al. (2020)
Reator vertical TNT	Águas cinzas. 29,8 mg N-NH ₄ ⁺ /L, 6,2 mg NO ₃ ⁻ mg/L e 24,5 Ps mg/ L Efluente bovino 137,5 mg N-NH ₄ ⁺ /L, 125 mg NO ₃ ⁻ mg/L e 131 Ps mg/ L Estrume digerido anaerobiamente 253,5 mg N-NH ₄ ⁺ /L, 72,6 mg NO ₃ ⁻ mg/L e 256,8 Ps mg/ L	0,12 ^a e 0,02 ^b	3,64	100 ^b 94,2 ^a	50,9	CHOUDHARY et al. (2017)
		0,55 ^a e 0,5 ^b	4,0	91 ^b 98 ^a	68,3	
		1,0 ^a e 0,29 ^b	3,1	93 ^a	69,9	
Biorreator de biofilme Espuma de PVC	Esgoto doméstico	1,2	0,5 – 3,1	70	70	POSADAS et al. (2013)
Pista de fluxo	Água residuária sintética 10 mg L ⁻¹ NO ₃ ⁻ e 1,1 mg L ⁻¹ PO ₄ ⁻³	3,5	4,5 - 9,9	-	49,9	BOELEE et al. (2014a)
Reator de biofilme Tecido poliéster	Esgoto doméstico	4,1	1,74 ± 0,19 (STV) 0,028 ± 0,003 (clorofila- <i>a</i>)	75,8 ^e 99,4 ^a	62,91	Esse estudo

^a valor para amônio; ^b valor para nitrato; ^c valores obtidos apenas no RB; ^d valor obtido para remoção de amônio no sistema híbrido; ^e remoção de NTK; ND: não determinado.

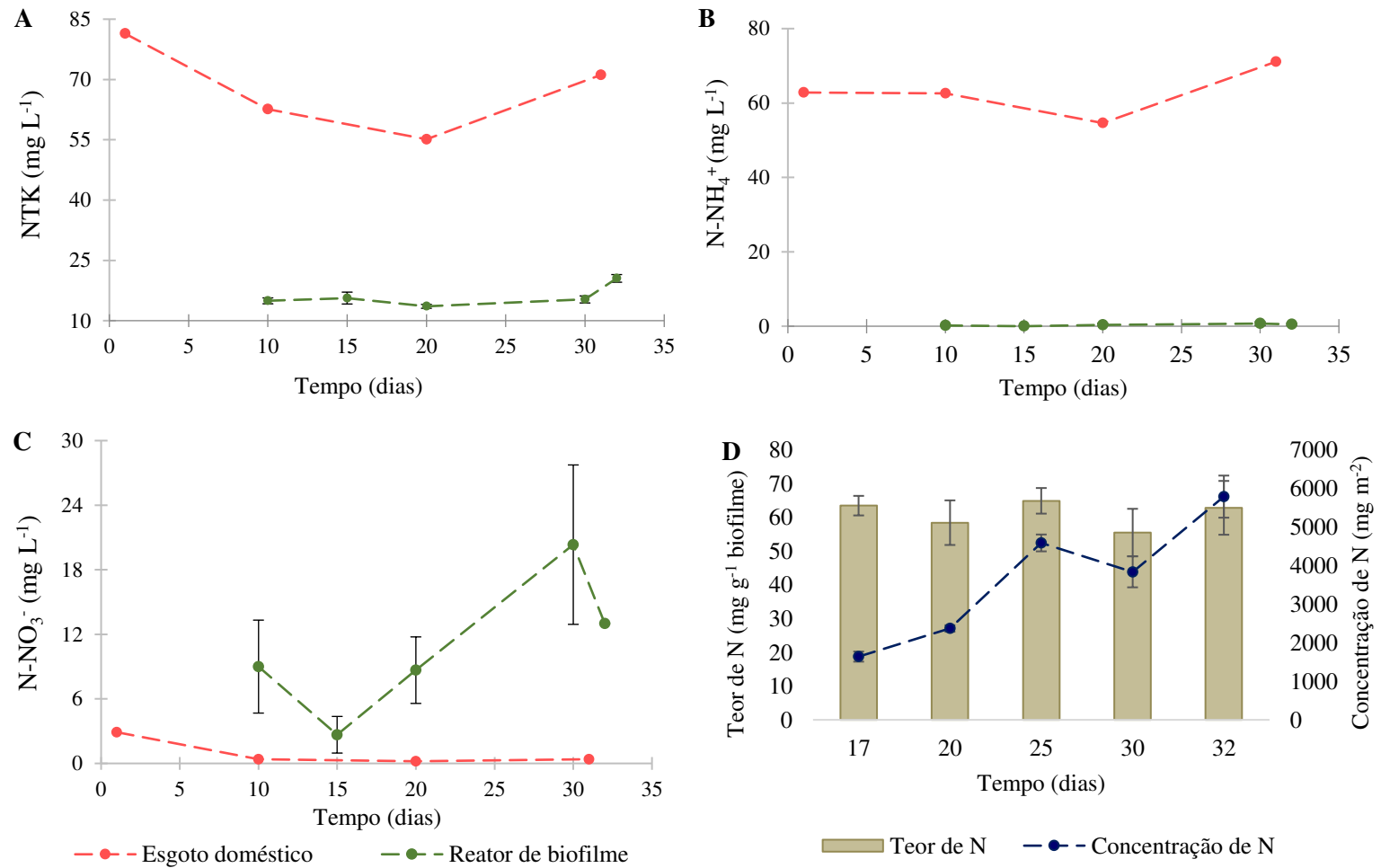
6.3.3. Taxa de remoção e balanço de massa nitrogênio

Os valores de NTK e N-NH_4^+ se mantiveram abaixo de 20,5 (0,9) e 0,7 (0,5) mg L^{-1} ao longo do experimento, respectivamente (Figuras 6.4a e 6.4b). Para o N-NO_3^- , apesar dos incrementos já mencionados, as concentrações se mantiveram abaixo de 20,3 (7,4) mg L^{-1} (Figuras 6.4c). As taxas de remoção de NTK e N-NH_4^+ foram de 10,4 e 9,5 $\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Essas taxas são superiores as relatadas por TAO et al. (2017) em um biorreator *airlift* de biofilme de 1,0 $\text{mg N L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Contudo, ressalta-se o incremento de nitrato no presente estudo.

A concentração de N no biofilme (Figura 6.4d) seguiu a mesma tendência da clorofila-a (Figura 6.3b), enquanto o teor de N também mostrou um comportamento próximo. Como o nitrogênio é um macroelemento essencial para microalgas e são utilizados na síntese de proteínas e ácidos nucleicos (KUBE et al., 2018), justifica-se as semelhanças nas tendências das variáveis e sugere que o N presente no biofilme é predominantemente aquele assimilado pela comunidade microalgal. Ao longo do experimento, o teor de N no biofilme atingiu o pico de 65,0 (3,8) $\text{mg g biofilme}^{-1}$ (peso seco) no dia 25 e a concentração de N no biofilme final foi de 5796,0 (546,5) mg m^{-2} .

Dessa forma, nas condições e dias avaliados, a assimilação de N pelo biofilme foi, em média, de 61,1 (3,5) $\text{mg g biofilme}^{-1}$, não demonstrando grandes variações ao longo da formação do biofilme. Esse resultado vai contra ao que era esperado, pois se acreditava que, à medida com o que o biofilme fosse se tornando mais espesso, as concentrações de EPS, que são responsáveis por manter o biofilme unido, pudessem contribuir para o aumento do teor de N.

Figura 6.4 – Valores de (a) NTK, (b) N-NH_4^+ , (c) N-NO_3^- , (d) teor (eixo a esquerda) e produção (eixo a direita) de N ao longo da formação do biofilme (n=3, barras verticais representam o desvio padrão).



Por outro lado, ainda que ocorra maior produção de EPS ao longo da formação do biofilme, as proporções de microalgas, bactérias e EPS variam de modo que o biofilme seja composto, principalmente, por uma população densa de células de microalgas (SCHNURR; ALLEN, 2015). Dessa forma, a concentração de proteínas do EPS do biofilme poderia ser, de fato, menos representativa para o conteúdo de N do biofilme. SHEN et al. (2016) reportaram razões EPS/biofilme variando de cerca de 85 a 40 mg g biofilme⁻¹, quando cultivados em águas residuárias de suinocultura, o que representa uma pequena proporção do biofilme. Assim, estudos futuros podem se concentrar em compreender quais os mecanismos e as formas de N presentes dentro do biofilme, o que contribuiria para otimizar a sua recuperação em RBs.

É possível observar uma tendência de espessamento do biofilme dentre os dias avaliados (Figura 6.3), apesar de não ser verificada grande variação no teor de N entre o 17º e 32º dia de cultivo. Apesar disso, o incremento de proteína do EPS poderia ter causado efeitos mais expressivos antes do dia 17 ou prolongando o período de cultivo e avaliação do biofilme. No presente estudo, isso não pode ser concluído. Ressalta-se que em estudo anterior (dados não apresentados), observou-se que a formação do biofilme aconteceu de forma predominante a partir da adesão de células oriundas do cultivo suspenso. A multiplicação de células por divisão celular dos microrganismos já aderidos ao meio suporte não foi observada, não ocorrendo o espessamento do biofilme pela aderência à matriz EPS. Dessa forma, suspeita-se da ausência dessas substâncias no biofilme, seja pelo estágio de maturação do biofilme ou pela incapacidade de espécies dominantes excretarem os EPS (seção 6.3.4).

Em termos de área, a produção de N variou em 1.642,2 mg N m⁻² (dia 17, ou seja, 96,6 mg N m⁻² dia⁻¹) a 5.796,0 mg N m⁻² (dia 32, ou seja, 120,1 mg N m⁻² dia⁻¹). Como o teor de N não variou na mesma proporção entre os dias avaliados, e houve um aumento da produção do biofilme, as concentrações de N também aumentaram, uma vez que a área disponível para o crescimento aderido é fixa. Compreender esse parâmetro pode orientar projetos de RBs para o tratamento de águas residuárias a respeito das necessidades de área de material suporte para o crescimento aderido a fim de recuperar de N por meio do biofilme.

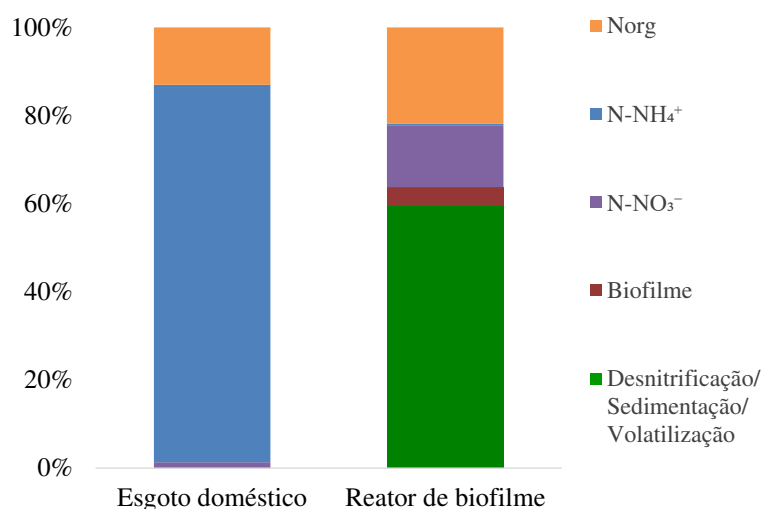
Apesar das concentrações de N (em especial N-NH₄⁺) no esgoto doméstico serem consideráveis, com médias de 62,79 mg N total L⁻¹, como ocorreu nitrificação e o pH elevado favorável à volatilização da amônia, o biofilme se desenvolveu em concentrações mais baixas de N. A carga e taxa de aplicação superficial médias de N

total que entraram na unidade de tratamento foram de 205,6 mg NT dia⁻¹ e 4,1 g NT m⁻² dia⁻¹ (considerando a área útil do RB), respectivamente. A recuperação de N no biofilme foi de 180,1 mg NT m⁻² dia⁻¹, considerando o teor observado no último dia de operação. Apesar das condições para assimilação de N pelas microalgas não terem sido ideais (devido ao pH), o seu teor no biofilme foi superior a aqueles observados por ASSIS et al. (2017), porém menor do que aqueles encontrados por POSADAS et al. (2013) e CHOUDHARY et al. (2017) (com exceção do biofilme crescido em águas cinzas), ainda que tenham sido aplicadas cargas menores de N (Tabela 6.2).

BOELEE et al. (2011) avaliaram os efeitos de diferentes taxas de aplicação de N e P aplicadas em RB (cultivado sob iluminação artificial de 40 mmol de fótons m⁻² s⁻¹ e concentrações de CO₂ mantidas em 2%) e observaram que os teores de N e P da biomassa aumentaram com o aumento das taxas de aplicação até valores máximos de 1,0 g N-NO₃⁻ m⁻² dia⁻¹ e de 0,13 g PO₄⁻³ m⁻² dia⁻¹. A partir disso, o teor de N tendeu a se estabilizar (0,048 g N g biomassa⁻¹), enquanto o de P cresceu em taxas baixas. ZHUANG; LI; NGO (2020) discutiram as relações entre as cargas de nitrogênio total e fósforo total e suas respectivas eficiências de remoção, baseado na revisão de 120 estudos voltados para o cultivo não suspenso em águas residuárias. Os autores verificaram que as taxas de N total e P total variaram amplamente de 0,1 a 150 mg L⁻¹ dia⁻¹ e que as eficiências máximas de remoção não apresentaram tendência decrescente proporcionalmente ao aumento da carga. Contudo, entre os estudos havia diferentes condições de cultura (ZHUANG; LI; NGO, 2020). Assim, acredita-se que a carga de nutrientes aplicada nos RBs e a capacidade de assimilação N na biomassa contida no biofilme pode ser mais bem explorada por estudos futuros.

O balanço de massa (Figura 6.5) reforça os resultados aqui mencionados (tópico 6.1) a respeito dos principais mecanismos de remoção de N. Cerca de 59,6% do N removido do esgoto doméstico foi relacionado aos processos de desnitrificação, sedimentação e volatilização, enquanto, por meio do biofilme, 4,2% de N foi recuperado. No esgoto tratado, foram quantificados remanescentes de N orgânico (21,8%), N-NH₄⁺ (0,5%) e N-NO₃⁻ (13,9%). O percentual de N orgânico inclui o N assimilado pela biomassa suspensa contida no meio de cultivo, explicando assim seu aumento em relação ao percentual inicial do esgoto doméstico (13,0%). Como o percentual inicial de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ eram de 1,3% e 85,7% no esgoto doméstico, respectivamente, há um comportamento inverso, com aumento do primeiro e decaimento do segundo.

Figura 6.5 – Formas de nitrogênio do esgoto doméstico bruto e tratado no RB.



Em balanços de massa realizados para cultivos suspenso foram relatados altas perdas de N para atmosfera (PULGARIN et al., 2021), sendo que o controle de pH e adição de CO₂ representam abordagens possíveis para otimizar a recuperação de N ou predominância do processo de nitrificação (COUTO et al., 2015). Pequeno incremento no conteúdo de N do biofilme produzido em sistemas híbridos (composto por lagoa de alta taxa e RB) de 40 mg N g biofilme⁻¹ para 49 mg N g biofilme⁻¹ ao incluir suplementação de CO₂ na lagoa foi relatado, mas não houve aumento significativo nas eficiências de tratamento de nutrientes de esgoto doméstico (ASSIS et al., 2017).

BOELEEE et al. (2014a) realizaram balanço de massa de N em RBs e observaram 26% e 63% de recuperação de N em biofilmes cuja colheita era realizada integral e parcialmente (considerando a área superficial do RB), respectivamente. Apesar do balanço de massa não ter sido concluído por BOELEEE et al. (2014a), o estudo demonstrou que adotar estratégias de colheitas parciais (metade da área do biofilme) oferece maior recuperação de N. Os conteúdos de N na raspagem integral (77,9%) e parcial (76,7%), correspondendo às diferenças da produtividade explicam essa vantagem.

Dessa forma, estudos futuros voltados para estratégias de recuperação de N por microalgas e, especialmente, em biofilme devem ser encorajados. Já foi demonstrado que a biomassa aderida oferece simplicidade a etapa de colheita, maior recuperação e concentração de sólidos, além de garantir menores impactos ambientais quando comparada a colheita por sedimentação gravitacional (FERREIRA

et al., 2020). Acredita-se que o RBs possam ser bem recebidos para o cultivo de microalgas em larga escala e, assim, o biofilme pode representar a principal forma de biomassa colhida. Ressalta-se que, para que novas estratégias sejam aplicáveis aos sistemas de tratamento de águas residuárias, elas devem ser traçadas considerando as limitações e desafios desse contexto, como as mudanças sazonais das condições climáticas, variabilidade das características das águas residuárias, policultivo de microrganismos e necessidade de baixos custos.

6.3.4. Mudanças da composição de microalgas durante a formação do biofilme

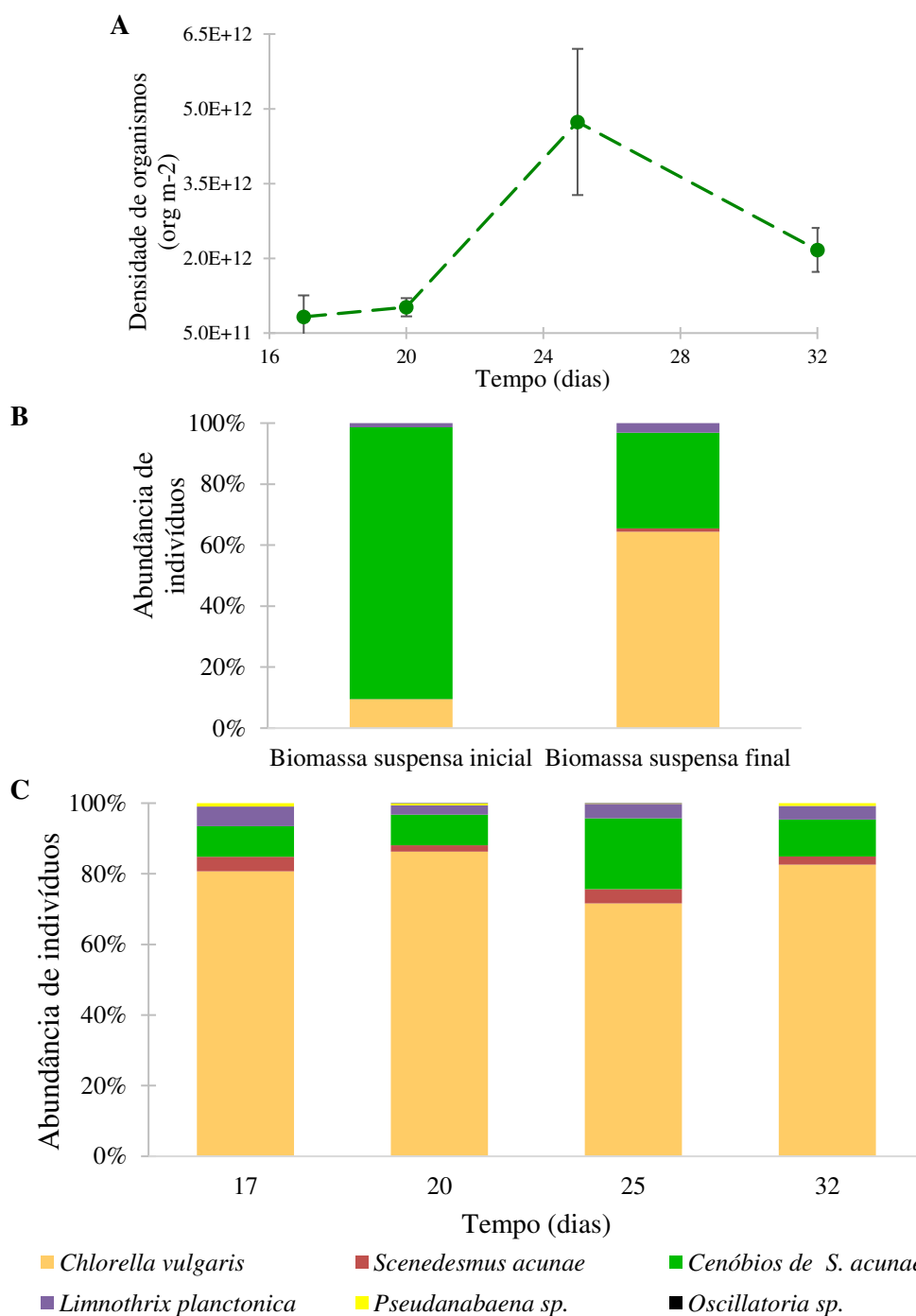
A densidade de organismos do biofilme em todos os RBs, em unidade logarítmica, foi de 10^{-11} org m^{-2} (17º dia) e se manteve em 10^{-12} org m^{-2} nos demais dias monitorados (Figura 6.6a). Esse resultado é próximo ao encontrado em outros estudos de crescimento aderido (ASSIS et al., 2020) e supera aqueles observados no crescimento suspenso (ASSIS et al., 2020). Maior concentração da biomassa por área contribui com reatores mais compactos, o que oferece vantagem para o cultivo baseado em biofilme.

O inóculo (biomassa suspensa inicial) utilizado no experimento foi caracterizado com abundância das clorófitas *Scenedesmus acunae* (89,0% de cenóbios e 0,2% de células individuais) e *Chlorella vulgaris* (9,4%) e da cianobactéria *Limnothrix planctonica* (1,4%) (Figura 6.6a). Ocorreram mudanças na abundância de espécies da biomassa suspensa e aderida final (dia 32) em relação ao inóculo utilizado (Figuras 6.6b e 6.6c). No final da operação, as mesmas espécies apresentaram as seguintes abundâncias: *Chlorella vulgaris* (64,4%), cenóbios de *S. acunae* (31,4% de cenóbios e 1,0% de células individuais) e *Limnothrix planctonica* (3,1%) para biomassa suspensa. Para o biofilme final, as abundâncias de *Chlorella vulgaris*, cenóbios de *S. acunae*, *Scenedesmus acunae* e *Limnothrix planctonica* foram de 82,6% (8,0), 2,3% (2,0), 10,5% (5,7), 3,9% (0,5) e, diferentemente do inóculo e biomassa suspensa, houve abundância de 0,8% (0,1) da cianobactéria do gênero *Pseudanabaena* sp. Os desvios padrões revelam pequenas mudanças na comunidade microalgal dos três reatores operados, o que sugere que o experimento proporcionou condições bastante semelhantes para o desenvolvimento do biofilme. A taxa específica de crescimento, para o intervalo 17 a 32 dias, foi de 0,06 (0,04) d^{-1} .

Comumente, em biofilmes fotossintéticos não axênicos, ocorre dominância de clorófitas unicelulares e filamentosas e de cianobactérias (SCHNURR; ALLEN,

2015). Os seus mecanismos de adesão podem variar, por exemplo, a maioria das cianobactérias se fixam ao material suporte por meio da produção de EPS (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). *Chlorella*, *Oscillatoria* e *Pseudanabaena* foram observados em biofilme de RBs de disco, cultivado em efluente do digestor anaeróbio (após passar por prensa de esteira) de uma estação voltada para o tratamento de águas residuárias municipais (HILLMAN; SIMS, 2020). O RB foi operado sob condições ambientais e com altos valores de RFA (valor médio diário máximo de $1.348 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (HILLMAN; SIMS, 2020). Os autores apontaram que, as microalgas, especialmente as espécies filamentosas, cresceram em camadas mais internas do biofilme, onde haveria sombreamento das camadas superiores e que a fotoinibição pode ter limitada o desenvolvimento de um biofilme com maior biodiversidade de microalgas (HILLMAN; SIMS, 2020).

Figura 6.6 – (a) Densidade total de organismos e abundâncias de indivíduos no (b) inóculo e (c) no biofilme ao longo de sua formação.



As mudanças da abundância de indivíduos da comunidade microalgal do biofilme revelou que a *Chlorella vulgaris* se manteve como espécie mais abundante nos dias avaliados (Figura 6.6c). BOELEE et al. (2014b) realizaram análise taxonômica das espécies presentes no biofilme (em diferentes meses de operação) e observaram a presença de *Pseudanabaena sp.*, *Chlorella sp.* e cepas do gênero

Scenedesmus sp., contudo, a espécie dominante em todos os dias monitorados foram da cianobactéria *Phormidium autumnale*. BOELEEE et al. (2014a) observaram a *Pseudanabaena* e *Scenedesmus* em camadas inferiores de biofilme cultivado RB vertical e os autores sugeriram que elas poderiam estar adaptadas a exposição prolongada a condições de limitação de luz.

ASSIS et al. (2020) observaram que a *Chlorella vulgaris* foi a espécie mais abundante (>60%) no RB (em maior parte de sua operação) alimentado com esgoto doméstico. A *Chlorella vulgaris* é incapaz de produzir EPS por si mesma (KATARZYNA; SAI; SINGH, 2015), requerendo a presença outras espécies presentes para a formação de biofilme (IRVING; ALLEN, 2011). Contudo, ela já foi observada em biofilme (sobre material de algodão) em condição axênica (GROSS et al., 2013).

Com exceção da *Chlorella vulgaris*, as demais espécies sofreram pequenas variações na abundância, com exceção de *S. acunae* (cenóbios) que se destacou no dia 25 (20% de abundância de indivíduos). Além das espécies e gênero mencionados, a cianobactéria *Oscillatoria* sp. foi observada em menor proporção (~0,1%) nos dias 20 e 25. De modo geral, não houver mudanças consideráveis na abundância dos indivíduos de microalgas do biofilme. Esse pode ser um fator que ajuda a justificar as poucas variações no teor e produção de N relatadas anteriormente (Figura 6.4d), uma vez que as relações estequiométricas N:P das microalgas variam conforme a espécie.

A sucessão das espécies do biofilme é afetada pela sua maturidade, fatores bióticos (tipo de espécies) e abióticos (intensidade de luz, temperatura, concentrações de nutrientes e taxas de cisalhamento) (SCHNURR; ALLEN, 2015). DI PIPPO et al. (2014) demonstraram que a diversidade diminui durante o desenvolvimento do biofilme. Microalgas do gênero *Scenedesmus* possuem crescimento rápido e são apontadas como responsáveis por encurtar a fase de atraso em biofilme cultivado em irradiância alta (DI PIPPO et al., 2014) e como pioneiras (ROESELERS; VAN LOOSDRECHT; MUYZER, 2007). Por outro lado, as cianobactérias possuem colonização mais lenta (DI PIPPO et al., 2014). ROESELERS; VAN LOOSDRECHT; MUYZER (2007) reportaram um biofilme no qual algas verdes foram pioneiras e cianobactérias dominaram a fase exponencial e madura.

PAQUETTE et al. (2020) também se dedicarem a investigar as mudanças na dinâmica de um biofilme inoculado com *Scenedesmus obliquus* e pré-condicionado com águas residuárias por meio de sequenciamento de genes de rRNA 16S e 18S. Os autores reportaram um aumento de cianobactérias, clorofíceas e diatomáceas,

sendo que *Chlorella* e *Leptolyngbya* se estabeleceram rapidamente, enquanto, após um o tempo, as diatomáceas e dinoflagelados fotoautotróficos. Os autores observaram que as clorofíceas se tornavam mais abundantes no período intermediário e, logo após, declinavam consideravelmente, quando as cianobactérias se tornaram dominantes ao final do experimento, possivelmente favorecidas pela limitação de luz causada pelo espessamento do biofilme, uma vez que ela supera as algumas algas verdes na absorção de luz (PAQUETTE et al., 2020).

Os relatos apresentados da literatura sugerem que as pequenas mudanças na abundância de indivíduos podem ser justificadas por algumas dessas hipóteses: (i) altos valores de RFA durante o experimento limitaram o estabelecimento das espécies encontradas ou (ii) após 17 dias, o biofilme já estava em uma fase mais madura e com espécies dominantes já estavam estabelecidas.

Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* têm se mostrado aplicáveis para o tratamento de águas residuárias, possuindo alta taxa de crescimento e alta tolerância ambiental (SUNDARRAJAN et al., 2019). Elas são capazes de se adaptar em diferentes águas residuárias e toleram ampla faixa de pH e temperatura. Similarmente, as cianobactérias que dominam biofilme fotoautotróficos suportam salinidade, acidez, dessecação, bem como uma ampla faixa de temperatura (BHARTI; VELMOUROUGANE; PRASANNA, 2017).

As águas residuárias são alternativas de baixo custo para o cultivo de microalgas e é provável que ela seja utilizada em escala industrial e em condição não estéril (PAQUETTE et al., 2020). Dessa forma, compreender a dinâmica natural de estabelecimento de espécies pode orientar melhores rotas de aproveitamento de bioprodutos/componentes mais favoráveis da biomassa e apoiar decisões operacionais, como o período de colheita.

6.3.5. Composição bioquímica do biofilme

Os teores de componentes bioquímicos do biofilme foram caracterizados (Tabela 6.3). A biomassa apresentou maior teor de proteína (35,0%), que foi próximo ao reportado por ASSIS et al. (2019), de 24,7%, com cultivo em esgoto doméstico. Por outro lado, os valores de cinzas (20,9%) e carboidratos (20,7%) dos autores foram maiores (ASSIS et al., 2019). A composição bioquímica das microalgas é influenciada pela composição bioquímica, pH e temperatura do meio de cultivo e pela intensidade luminosa (KESAANO et al., 2015). Águas residuárias com maior disponibilidade de N

resultam em uma biomassa com maior quantidade de proteínas, como observado por CHOUDHARY et al. (2017). Os valores de carboidratos e lipídeos neutros e de membrana foram próximos aos observados por ASSIS et al. (2020).

Tabela 6.3 – Caracterização bioquímica da biomassa aderida.

Componente bioquímico	%
Carboidratos	13,3 (1,5)
Proteínas	35,0 (0,8)
Lipídeos neutros	5,3 (0,2)
Lipídeos de membrana	11,0 (0,3)
Cinzas	13,1 (0,2)
Umidade	4,0 (0,09)

Nota: valores médios e desvio padrão em parênteses calculados em função do peso seco do biofilme.

Foi demonstrado que o conteúdo de lipídeos não é afetado pelo tipo de material suporte utilizado (GENIN; AITCHISON; ALLEN, 2014; JOHNSON; WEN, 2010; SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2013), contudo, é influenciado pela limitação de N (CHOUDHRY et al., 2017), intensidade de luz e composição de espécies (KUMAR et al., 2019; XU et al., 2017). KUMAR et al. (2019) observaram, ao realizar cultivo sintético de consórcios de microalgas (compostos predominantemente por *Chlorella* e *Scenedesmus*) em escala de laboratório, que o aumento da intensidade de luz (100, 200 e 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) possui correlação significativa e positiva com a produção de lipídeos. Apesar do cultivo ocorrer em altas intensidades de luz, as concentrações de N levaram a um maior teor de proteínas.

A produção de lipídeos neutros foi de 0,05 (0,01) g m^{-2} (0,002 $\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$). Esse resultado é menor do que a produtividade lipídica (0,06 a 0,13 $\text{g m}^{-2} \text{dia}^{-1}$) reportada por GENIN; AITCHISON; ALLEN (2014), apesar do conteúdo lipídico ter sido próximo 6 – 8%. A diferença entre as produtividades lipídicas pode ser explicada pelas diferenças na produtividade dos biofilmes. Em biofilme em cultivo não estéril, normalmente, há muito mais EPS, bactérias e cianobactérias em sua composição, que possuem teor lipídico menor, o que, conseqüentemente, afeta a produtividade lipídica da biomassa total (SCHNURR; ALLEN, 2015).

6.4. Conclusões

Durante o desenvolvimento do biofilme, os processos de sedimentação, volatilização e nitrificação foram os principais mecanismos de remoção de N e apenas 4,2% de N foi recuperado no biofilme colhido. Ainda são necessários esforços para desenvolver estratégias voltadas para obter maior conteúdo de N no biofilme, especialmente, considerando que esse método de cultivo oferece colheitas mais simples e com maiores eficiências de recuperação da biomassa. A produção de N do biofilme não sofreu grandes variações ao longo dos dias monitorados e seguiu a mesma das concentrações de clorofila-*a*, dessa forma, acredita-se que a produção de organismos fotossintetizantes é o que favorece a recuperação de N no biofilme.

Não houve grandes variações da comunidade microalgal, uma vez que as mesmas espécies mais abundantes foram observadas ao longo dos dias avaliados. A *Chlorella vulgaris* teve abundância acima de 72% nos dias monitorados. Como as águas residuárias precisam de tratamento e são candidatas de baixo custo para a produção de microalgas, compreender a mudança e composição final de espécies do biofilme pode contribuir como o monitoramento e operação da unidade de tratamento e orientar estratégias de gestão da biomassa colhida.

6.5. Referências

AHLGREN, G. et al. Fatty-acid content and chemical-composition of fresh-water microalgae. **Journal of Phycology**, 28 (1), 37–50, 1992.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. APHA-AWWA-WEF, Washington, DC. 2012.

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis, seventeenth ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, Maryland.

ASSIS, L. R. et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.

ASSIS, L. R. et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. January, p. 101440, 2019.

ASSIS, L. R. et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. April, p. 111183, 2020.

BHARTI, A.; VELMOUROUGANE, K.; PRASANNA, R. Phototrophic biofilms: diversity, ecology and applications. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 6, p. 2729–2744, 2017.

BLANKEN, W. et al. Optimizing carbon dioxide utilization for microalgae biofilm cultivation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 769–776, 2017.

BOELEE, N. C. et al. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. **Water Research**, v. 45, n. 18, p. 5925–5933, 2011.

BOELEE, N. C. et al. The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1439–1452, 2014a.

BOELEE, N. C. et al. Nutrient removal and biomass production in an outdoor pilot-scale phototrophic biofilm reactor for effluent polishing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 405–422, 2014b.

CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 135088, 2020.

CASTRO, J. DE S. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications. **Science of the Total Environment**, v. 768, p. 144480, 2021.

CHOUDHARY, P. et al. Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 276–284, 2017.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. Biomass production in high rate ponds and hydrothermal liquefaction: Wastewater treatment and bioenergy integration. **Science of the Total Environment**, v. 724, p. 138104, 2020.

COUTO, E. et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, 2015.

DI PIPPO, F. et al. Diversity and biomass accumulation in cultured phototrophic biofilms. **European Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 384–394, 2014.

DUBOC, P. et al. Quantitative calorimetry and biochemical engineering. In: Kemp, R.B. (Ed.), *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*, vol. 4, 1999.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, 350–356, 1956.

FERREIRA, A. et al. *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO₂ biofixation for green energy purposes. **Journal of Cleaner Production**, v. 165, p. 1316–1327, 2017.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

GENIN, S. N.; STEWART AITCHISON, J.; GRANT ALLEN, D. Design of algal film photobioreactors: Material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 136–143, 2014.

GROSS, M. et al. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 195–201, 2013.

HEALEY, F.P. Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *Critical Reviews in Microbiology* 3, 69–113, 1973.

HILLMAN, K. M.; SIMS, R. C. Struvite formation associated with the microalgae biofilm matrix of a rotating algal biofilm reactor (RABR) during nutrient removal from municipal wastewater. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 4, p. 644–655, 2020.

HOEBLER, C. et al. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 360 – 367, 1989.

IRVING, T. E.; ALLEN, D. G. Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 283–294, 2011.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 525–534, 2010.

KATARZYNA, L.; SAI, G.; AVIJEET SINGH, O. Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: Literature review and research needs. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1418–1427, 2015.

KOMAREK, J., FOTT, B., 1983. Das Phytoplankton des Süßwasser Systematik und Biologie Teil 7,1. In: Elster, Chlorococcales H.-J., Ohle, W. (Eds.), Die Binnengewässer, Begründet von August Thienemann, Stuttgart. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung.

KUBE, M. et al. The impact of wastewater characteristics, algal species selection and immobilisation on simultaneous nitrogen and phosphorus removal. **Algal Research**, v. 31, n. December 2017, p. 478–488, 2018.

KUMAR, G. et al. Effects of light intensity on biomass, carbohydrate and fatty acid compositions of three different mixed consortia from natural ecological water bodies. **Journal of Environmental Management**, v. 230, n. September 2018, p. 293–300, 2019.

LEE, S. H. et al. Higher biomass productivity of microalgae in an attached growth system, using wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1566–1573, 2014.

LIN-LAN, Z.; JING-HAN, W.; HONG-YING, H. Differences between attached and suspended microalgal cells in ssPBR from the perspective of physiological properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 181, n. February, p. 164–169, 2018.

LIU, J. et al. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1127–1137, 2017.

LU, W. et al. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO₂ from livestock farms: A review. **Science of the Total Environment**, v. 716, p. 135247, 2020.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 3187–3201, 2019.

MARKER, A.F.H., et al. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusion and recommendations. **Arch. Hydrobiol. Beih.** 14, 91–106, 1980.

MIYAWAKI, B. et al. Microalgae derived biomass and bioenergy production enhancement through biogas purification and wastewater treatment. **Renewable Energy**, v. 163, p. 1153–1165, 2021.

NAGARAJAN, D. et al. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. **Bioresource Technology**, v. 302, n. January, p. 122817, 2020.

NARALA, R. R. et al. Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. **Frontiers in Energy Research**, v. 4, n. AUG, 2016.

NICCOLAI, A. et al. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. **Algal Research**, v. 42, n. April, 2019.

PAQUETTE, A. J. et al. Dynamic changes in community composition of Scenedesmus-seeded artificial, engineered microalgal biofilms. **Algal Research**, v. 46, n. January, 2020.

PARRA, O.O. et al. Manual taxonômico del fitoplancton de aguas continentales: con especial referencia al fitoplancton de Chile. Parte I: Chlorophyceae. Universidad de Concepcion, Concepcion, 1982.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Algal recycling enhances algal productivity and settleability in *Pediastrum boryanum* pure cultures. **Water Research**, v. 87, p. 97–104, 2015.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Organomineral fertilizers pastilles from microalgae grown in wastewater: Ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 779, 2021.

POSADAS, E. et al. Carbon and nutrient removal from centrates and domestic

wastewater using algal-bacterial biofilm bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 50–58, 2013.

PULGARIN, A. et al. Cultivation of microalgae at high-density with pretreated liquid digestate as a nitrogen source: Fate of nitrogen and improvements on growth limitations. **Journal of Cleaner Production**, v. 324, p. 129238, 2021.

QUIJANO, G.; ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G. Microalgal-bacterial aggregates: Applications and perspectives for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 772–781, 2017.

ROESELERS, G.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; MUYZER, G. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 3, p. 578–585, 2007.

ROSLI, S. S. et al. Modeling to enhance attached microalgal biomass growth onto fluidized beds packed in nutrients-rich wastewater whilst simultaneously biofixing CO₂ into lipid for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 185, n. January, p. 1–10, 2019.

SARTORY, D.P.; GROBBELAAR, J.U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, p. 177–187, 1984.

SCHNURR, P. J.; ALLEN, D. G. Factors affecting algae biofilm growth and lipid production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 418–429, 2015.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 337–344, 2013.

SCHWARZBOLD, A., BURLIGA, A.L., TORGAN, L.C., 2013. **Ecologia Do Perífiton**. RiMa Editora, São Carlos ([in Portuguese]).

SHEN, Y. et al. Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 481–488, 2015.

SHEN, Y. et al. Biofilm formation in attached microalgal reactors. **Bioprocess and**

Biosystems Engineering, v. 39, n. 8, p. 1281–1288, 2016.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Development and Applications of Attached Growth System for Microalgae Biomass Production. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 3, p. 709–722, 2021.

SUNDARRAJAN, P. S. et al. A review on cleaner production of biofuel feedstock from integrated CO₂ sequestration and wastewater treatment system. **Journal of Cleaner Production**, v. 210, p. 445–458, 2019.

TAO, Q. et al. Enhanced biomass/biofuel production and nutrient removal in an algal biofilm airlift photobioreactor. **Algal Research**, v. 21, p. 9–15, 2017.

UTHERMÖL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.: Mitt., v. 9 (1), p. 1–38, 1958.

XU, X. Q. et al. Attached microalgae cultivation and nutrients removal in a novel capillary-driven photo-biofilm reactor. **Algal Research**, v. 27, n. September, p. 198–205, 2017.

YADAV, G. et al. Effective valorization of microalgal biomass for the production of nutritional fish-feed supplements. **Journal of Cleaner Production**, v. 243, p. 118697, 2020.

YU, Z. et al. Inclined algal biofilm photobioreactor (IABPBR) for cost-effective cultivation of lipid-rich microalgae and treatment of seawater-diluted anaerobically digested effluent from kitchen waste with the aid of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 315, n. June, 2020.

YUAN, H. et al. Effect of light spectra on microalgal biofilm: Cell growth, photosynthetic property, and main organic composition. **Renewable Energy**, v. 157, p. 83–89, 2020.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological Analysis**. 3^a ed. New York: Springer-Verlag. 2000. 429p.

ZHANG, Q. et al. Vertical-algal-biofilm enhanced raceway pond for cost-effective wastewater treatment and value-added products production. **Water Research**, v. 139, p. 144–157, 2018.

ZHONG, W. et al. Biogas productivity by codigesting Taihu blue algae with corn straw

as an external carbon source, **Bioresource Technology**, v. 114, p. 281-286, 2012.

ZHUANG, L. L.; LI, M.; HAO NGO, H. Non-suspended microalgae cultivation for wastewater refinery and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 308, n. February, p. 123320, 2020.

7. CAPÍTULO III. EFEITOS DO PERÍODO DE COLHEITA DE BIOFILME MICROALGAL-BACTERIANO CULTIVADO EM ESGOTO DOMÉSTICO NA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E BIOPRODUTOS

Resumo

Os sistemas de cultivo aderido têm se mostrado promissores para o cultivo de microalgas e aplicáveis ao tratamento de águas residuárias. Dentre os parâmetros de operação que interferem em sua performance, cita-se o período de colheita, cujos efeitos na produção de biomassa e bioprodutos ainda merecem atenção. Nesse sentido, o presente estudo buscou avaliar os efeitos de diferentes períodos de colheita na produção de biomassa e carotenoides. A sua influência durante o tratamento de esgoto doméstico também foi investigada. Reatores de biofilme foram operados em condições *outdoor* e avaliados em períodos de colheita de 12, 18 e 24 dias. Variáveis de qualidade de água foram monitorados ao longo do experimento e, a cada colheita, o rendimento e produtividade de biomassa total, clorofila-a e carotenoides foram quantificados. A performance dos reatores para remoção de nitrogênio amoniacal e fósforo solúvel não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$). O biofilme colhido em 18 dias teve produção de biomassa total e clorofila-a 2,7 e 3,2 vezes maior, respectivamente, quando comparado a colheita em 12 dias. Por outro lado, maior produtividade de carotenoides foi observada para o menor período de colheita. Assim, a determinação do período de colheita deve estar atrelada a rota de valorização da biomassa que se deseja e se adeque a escala e contexto de estações de estações de tratamento de águas residuárias.

Palavras-chave: Crescimento aderido. Microalgas. Colheita. Carotenoides. Tratamento de águas residuárias. Recuperação de recursos.

7.1. Introdução

Os sistemas de crescimento aderido de microalgas possuem potencial para aplicação no tratamento de águas residuárias (SINGH; PATIDAR, 2021). As águas residuárias, por sua vez, representam um meio de cultivo de microalgas de baixo custo (COUTO; CALIJURI; ASSEMAN, 2020) e são uma fonte para recuperação de energia e nutrientes em uma perspectiva de bioeconomia circular (NAGARAJAN et al., 2020). Para aplicação bem sucedida dessas tecnologias, a otimização de parâmetros operacionais é importante para o desempenho contínuo e estável durante o tratamento de águas residuárias a longo prazo (LI et al., 2019).

O intervalo entre colheitas é um fator que influencia na formação do biofilme e que, conseqüentemente, pode afetar a performance dos reatores de biofilme (RBs). Os efeitos desse parâmetro sobre a produtividade de biomassa têm atraído atenção de pesquisadores (BOELEE et al., 2014; CHOUDHARY et al., 2017; GROSS et al., 2013; JOHNSON; WEN, 2010; SHEN et al., 2014) e sua compreensão pode ser fundamental para o desenvolvimento técnico dos RBs e otimização de produção de biomassa e biorremediação.

Acredita-se que o período da colheita possa ser um parâmetro para ajustar a produtividade de biomassa de microalgas. Intervalos muito curtos podem provocar constantes fases de retardo no crescimento de células de microalgas, levando a crescimento celular mínimo e exigindo suas constantes adaptações ao ambiente (GROSS et al., 2013; WANG et al., 2018). Por outro lado, à medida que o biofilme cresce, em determinada espessura, as células começam a desprender do biofilme/material suporte devido a morte celular, parasitismo e privação de nutrientes em camadas mais profundas (MANTZOROU; VERVERIDIS, 2019). Em condições de deficiência de nutrientes, as substâncias poliméricas extracelulares (EPSs) presentes no biofilme podem ser degradadas pelas microalgas com dois diferentes propósitos: para se alimentarem ou para que se desconectarem do biofilme em busca de lugares mais favoráveis para o seu desenvolvimento (SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2013). Logo, não são recomendados intervalos entre as colheitas muito longos ou curtos.

Ainda não existe um período ótimo de colheita na literatura e sua aplicação varia entre 7 a 42 dias (ASSIS et al., 2017; LEE et al., 2014; ZHANG et al., 2018). Dentre os estudos mais recentes que se dedicaram a avaliar esse parâmetro e seus efeitos sobre sua produtividade, BOELEE et al. (2014) avaliaram a frequência e forma

de colheita de um biofilme fotoautotrófico aderido em reator plano vertical e cultivado em águas residuárias sintéticas, com suplementação de CO₂ e sob luz contínua artificial. O estudo de GROSS et al., (2013) foi realizado em RB rotativo e o CHOUDHARY et al. (2017) avaliaram RB inclinado em meio sintético. Apesar dos estudos terem sido realizados em diferentes condições de cultivo e com reatores de *design* diferentes, seus resultados concordaram com períodos de colheita próximas ou iguais (de 6 e 7 dias). Contudo, BOELEE et al. (2014) reportaram que não foi possível observar uma diferença clara da produtividade de biomassa com diferentes períodos de raspagens (2, 4 e 7 dias), mas que há vantagens da colheita parcial do biofilme sobre a total (produtividade cerca de 2,5 vezes maior). Apesar desses avanços para etapa de colheita, ainda não é possível aferir um intervalo de colheita ideal que combine o uso de águas residuárias reais e condições de cultivo *outdoor*.

SHEN et al. (2014) demonstraram como as concentrações de nitrogênio podem orientar o período ideal para o cultivo. Maior período de cultivo é interessante para o cultivo com deficiência de nitrogênio de modo a aumentar a produção de biomassa. Por outro lado, em condições suficientes de nitrogênio, maior quantidade de biomassa pode ser obtida em menor período de colheita (SHEN et al., 2014). Os autores identificaram, ao operar uma câmara de crescimento com materiais suportes (*glass fiber-reinforced plastic*) fixados ao fundo, maior produtividade de biofilme (4,26 g m⁻² d⁻¹) em um período ótimo de cultivo de 11 dias, que esteve associada às seguintes condições otimizadas de cultivo: concentração inicial de nitrogênio total de 70 mg L⁻¹, pH = 8 e volume do meio de cultivo de 340 mL. Os períodos de cultivo estudados foram 7, 10, 13 e 19 dias. Dessa forma, acredita-se que o período de colheita é um parâmetro que pode ser mais explorado.

Os efeitos sobre a produtividade de biocompostos de alto valor agregado obtidos da biomassa de microalgas também merecem atenção. Ao avaliar tempo de colheita em 6, 10 e 15 dias, JOHNSON; WEN, (2010) observaram que a produtividade de biomassa do biofilme se estabilizava entre 10 e 15 dias, porém, em 10 dias ocorria maior produtividade de ácidos graxos.

Os carotenoides, por sua vez, são outros bioprodutos de valor agregado que vêm atraindo cada vez mais atenção. Eles são importante fontes de antioxidantes e são usados comercialmente na alimentação animal (gado e peixes), como corantes naturais e em produtos alimentícios e cosméticos (SIDDIKI et al., 2022). A produção de carotenoides já foi demonstrada em cultivo suspenso (GOUVEIA et al., 2014;

PANCHA et al., 2014) e, recentemente, para o cultivo aderido, foi demonstrado que em condições de alta salinidade, ocorre um estímulo da produção de carotenoides pelas microalgas (YU et al., 2020). Contudo, acredita-se que ainda não há relatos da influência do período de colheita sobre sua produção de carotenoides do biofilme. Como há um gradiente de intensidade de luz ao longo da profundidade do biofilme, o que pode provocar um gradiente de pigmento pela adaptação do conteúdo de pigmento celular (PODOLA; LI; MELKONIAN, 2017), acredita-se que realizar colheitas em diferentes intervalos pode afetar na produção de carotenoides.

Diante disso, o presente estudo se dedicou a compreender os efeitos de diferentes períodos de colheita de biofilme sobre a produtividade de biomassa e carotenoides. O estudo teve como diferencial, em relação aos estudos mencionados, o uso de esgoto doméstico real e rico em nitrogênio amoniacal ($N-NH_4^+$), além de ser conduzido sob condições externas. Dessa forma, o estudo também se dedicou a demonstrar o potencial do RB como tratamento terciário de águas residuárias tratadas previamente em sistema anaeróbio. Além disso, outras inovações para esse campo de pesquisa são (i) caracterizar quantitativamente a produção de carotenoides totais de biomassa aderida e (ii) compreender os efeitos do período de colheita sobre a produção de carotenoides totais.

7.2. Materiais e métodos

O experimento foi conduzido na área experimental localizada na parte externa do Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil ($20^{\circ}45'14''S$ e $42^{\circ}52'54''O$). Ele foi realizado entre o final de novembro (2021) e início de janeiro (2022), que correspondem a primavera e verão, respectivamente. O município de Viçosa possui clima tropical de altitude, com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos (COUTO et al., 2015).

7.2.1. Design do reator de biofilme

O RB foi confeccionado com um material suporte composto por uma placa de poliestireno (que ofereceu sustentação) revestido por tecido poliéster (Sk têxtil, oxford, 100% poliéster), que foi adotado como material para aderência e desenvolvimento do biofilme baseado nos resultados de sua performance relatados na literatura (ASSIS et al., 2019; XU et al., 2017; YU et al., 2020). O material suporte possuía 0,39 m de

comprimento total, 0,23 m de largura total (área total = 0,0897 m²) e comprimento útil de 0,22 m² (área útil = 0,0506 m²). O RB foi fixado entre em uma bandeja (39 x 26 x 7 cm, Plasútil) e um suporte confeccionado em tubos de PVC (diâmetro = 10 cm, comprimento = 31 cm, abertura longitudinal = 21 x 1 cm). Ele ficou inclinado em 19° em relação a horizontal. A bandeja possuía uma abertura longitudinal de 15,7 cm² no centro inferior, no qual o meio de cultivo foi drenado por gravidade para uma caixa plástica (0,38 m de comprimento, 0,31 m de largura, área superficial = 0,118 m² e volume útil = 18 L), que o armazenava.

O meio de cultivo foi continuamente recirculado da caixa plástica para o material suporte com auxílio de uma bomba subaquática (Sarlobetter, modelo S520), de vazão nominal de 520 L h⁻¹, e distribuído por meio de um conjunto de mangueiras e pelo tubo de PVC, que foi preenchido com brita nº 1 a fim de uniformizar o fluxo ao longo do reator. As bombas ficavam localizadas dentro da caixa plástica. O volume de trabalho adotado para o meio de cultivo foi de 18 L, sendo que o volume de água evaporada do meio de cultivo foi repostado com água destilada diariamente. A Figura 7.1 apresenta os RBs no 11º dia de operação.

Figura 7.1 – Sistema de cultivo de crescimento aderido.



Os RBs foram instalados em local onde recebia iluminação natural direta (condições *outdoor*) e orientados para o norte para garantir a incidência de radiação solar direta. Durante os eventos de chuva e a noite, eles foram cobertos com plástico, que reduz a radiação fotossinteticamente ativa (RAF) em cerca de 30%, a fim de evitar o carreamento de biomassa e a diluição do meio de cultivo.

7.2.2. Coleta e caracterização do esgoto doméstico e inóculo

O meio de cultivo utilizado foi esgoto doméstico coletado em uma estação de tratamento de águas residuárias municipais localizada em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O ponto de coleta foi após tratamento preliminar, primário (decantador) e em tanque séptico. O esgoto doméstico foi caracterizado pelas seguintes variáveis de qualidade de água: pH, oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio solúvel (DQOs), nitrogênio amoniacal total (N-NH₄⁺), nitrato (N-NO₃⁻) e fósforo solúvel (Ps). Os procedimentos analíticos para determinação das variáveis serão descritos a seguir na Seção 7.2.4.1.

Um inóculo (biomassa suspensa) foi adicionado ao meio de cultivo (10% v/v) e continha como espécies mais abundantes eram *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acunae* e *Limnothrix planctonica*. Além disso, os materiais suportes dos RBs estavam inoculados (biomassa aderida) com espécies de um biofilme raspado imediatamente antes do início da operação, no qual as espécies de microalgas mais abundantes foram as mesmas mencionadas, acrescida da cianobactéria *Pseudanabaena* sp. Dessa forma, o biofilme foi formado a partir do primeiro ciclo de crescimento das células presentes no material suporte e por meio da adesão de células presentes no meio de cultivo. Já foi demonstrado que a presença de inóculo no material suporte reduz o tempo de inatividade na fixação inicial de células, o que resulta em maior produtividade (CHRISTENSON; SIMS, 2012; GROSS et al., 2013; JOHNSON; WEN, 2010). Além disso, considerando a operação contínua do reator, os dados obtidos a partir do segundo ciclo de crescimento representam o crescimento em estado estacionário (GROSS et al., 2013).

7.2.3. Operação dos reatores de biofilme

Os reatores foram operados em regime semi-contínuo, com vazão de projeto de 3 L dia⁻¹ e TDH de 6 dias. As bombas subaquáticas, responsáveis pela recirculação meio de cultivo, operaram durante 12 horas por dia (de 6h às 18h), dessa forma, o biofilme ficou em contato com o meio de cultivo durante o dia e, pela noite, apenas em contato com o ar.

Os períodos de colheita avaliadas foram de 12, 18 e 24 dias, aqui nomeados como tratamento 1 (T1), tratamento 2 (T2) e tratamento 3 (T3), respectivamente (Tabela 7.1). Esses períodos foram definidas com base nos relatos da literatura

(BOELEEE et al., 2014; GROSS et al., 2013; ASSIS et al., 2020) e em observações do tempo de crescimento de biofilme (após colheita parcial) em um estudo anterior (dados não apresentados) realizado sobre as mesmas condições de cultivo realizadas no presente estudo que revelou um tempo mínimo de crescimento do biofilme (após uma raspagem) de 10 dias. Além disso, como uma vantagem dos sistemas de crescimento aderido é desvincular o TDH e tempo de residência celular (θ_c) (ZHUANG; LI; NGO, 2020), buscou-se garantir relação de θ_c /TDH maior que 1.

Tabela 7.1 – Delineamento experimental.

Tratamento	Período de colheita (dias)	Período total de cultivo (dias)	Número de colheitas	Relação θ_c /TDH ^a
1	12	48	4	2
2	18	36	2	3
3	24	48	2	4

A Tabela 7.1 resume parâmetros do delineamento experimental. Cada tratamento foi realizado em duplicata e foram realizadas quatro (T1) e duas (T2 e T3) colheitas do biofilme. Ressalta-se que, como o período de colheita do T1 foi menor, para esse tratamento foi possível realizar maior número de ciclos de crescimento do biofilme, aqui entendidos como o tempo em que o biofilme cresce até que seja raspado. Dessa forma, os reatores operaram em períodos totais de cultivo próximos e sujeitos as mesmas condições ambientais. Após a coleta de amostras para determinar produção de biomassa e bioprodutos, todo o biofilme era raspado, conforme cada período de raspagem.

7.2.4. Procedimentos analíticos

7.2.4.1 Monitoramento das condições ambientais e da performance do tratamento

Ao longo do experimento, houve monitoramento diário (entre 11h40 e 12h40) das condições do meio de cultivo (pH, temperatura, concentração e saturação de oxigênio dissolvido - OD) com auxílio de sonda multiparâmetro (Hach, modelo HQ40d) e da RFA no local com radiômetro (LI-COR, LI-1500). Durante os eventos de chuvas a RFA foi medida debaixo do plástico que recobria os reatores, medindo a radiação

disponível a eles. Além disso, foram obtidos dados da radiação ao longo do dia durante o experimento (INMET, 2022) (Apêndice C).

As variáveis de qualidade de água DQOs (método 5220 D), N-NH₄⁺ (método 4500-NH₃ C), N-NO₃⁻ (método 4500-NO₃⁻ A) e Ps foram quantificadas antes e durante o experimento a fim de determinar suas respectivas eficiências de remoção. As análises foram realizadas em laboratório seguindo as especificações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA-AWWA-WEF, 2012). As análises do esgoto doméstico tratado foram realizadas nos dias 10^o, 23^o e 35^o dias de operação.

7.2.4.2 Produção de biomassa aderida

Ao final de cada ciclo de crescimento, amostras de 4 cm², raspadas com espátula em quatro diferentes locais do biofilme, foram obtidas a fim de determinar as concentrações de sólidos totais voláteis (STV) e clorofila-a. Os STVs foram mensurados conforme APHA-AWWA-WEF (2012) (método 2540 E, 2012) a fim de quantificar, indiretamente, a biomassa total do biofilme. Por outro lado, a clorofila-a foi utilizada como medida indireta para determinar a biomassa de microalgas. Para determiná-la, as amostras foram diluídas previamente em água destilada e, após, realizou-se a técnica de extração com etanol 80% a quente, com leitura realizada em espectrofotômetro (Hach DR 3800) e cálculos usando as equações descritas por SCHWARZBOLD et al. (2013), adaptada de MARKER et al. (1980) e SARTORY; GROBBELAAR (1984) (Equação 7.1). As análises foram realizadas em duplicata para cada reator e os resultados foram apresentados em termos de produção e produtividade.

$$\text{Clorofila - a (ug.cm}^{-2}\text{)} = \frac{(Eb-Ea) \times \left(\frac{R}{R-1}\right) \times k \times w \times V}{S \times L} \quad \text{Eq. 7.1}$$

Em que Eb é absorvância do extrato a 665 nm menos a absorvância a 750 nm, antes da acidificação, Ea é absorvância do extrato a 665 nm menos a absorvância a 750 nm, depois da acidificação, R = 1,72 (razão de rendimento da clorofila-a não acidificada, conforme WETZEL; LIKENS (2000)), R/(R-1) = 2,39, k = 27,9 (coeficiente de absorção da clorofila-a para 80% etanol), V é o volume do solvente utilizado (mL), L é comprimento do caminho óptico através da cubeta (1 cm) e S é a área total de biofilme raspado por amostra (cm²).

7.2.4.3 Carotenoides totais

Amostras foram obtidas seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente (Seção 7.2.4.2). Após, os carotenoides totais foram mensurados conforme a metodologia descrita por PANCHÁ et al. (2014) e foram feitas adaptações segundo PORRA (1990). As amostras foram diluídas em água destilada e centrifugadas (em centrífuga Hoffman, modelo HCL 4) a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 5 mL de metanol 99,9%. As amostras foram submetidas a banho-maria a 60 °C por 20 minutos e, em seguida, foram incubadas a 45 °C por 24 horas no escuro. Após, foi realizada leitura em espectrofotômetro (Hach DR 3800) nos comprimentos de onda de 470, 652, 665 e 750 nm. Os resultados foram aplicados nas equações desenvolvidas por LICHTENTHALER (1987), que foram adaptadas no presente estudo (Eqs. 7.2, 7.3 e 7.4). A Eq. 7.4 foi adaptada para determinar a quantidade de carotenoides totais por área do biofilme. Além disso, no presente estudo, foram medidas absorvâncias de 652 e 665, que são próximas aquelas (652,4 e 665,2) determinadas por LICHTENTHALER (1987).

$$\text{Clorofila - a} = 16,72A_{665} - 9,16A_{652} \quad \text{Eq. 7.2}$$

$$\text{Clorofila - b} = 34,09A_{652} - 15,28A_{665} \quad \text{Eq. 7.3}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{(1000A_{470} - 1,63\text{Clorofila-a} - 104,9\text{Clorofila-b})}{221} \times \frac{V_e}{S \times 1000} \quad \text{Eq. 7.4}$$

Em que clorofila-a e clorofila-b correspondem a concentração desses pigmentos no solvente ($\mu\text{g mL}^{-1}$); A_{470} , A_{665} e A_{652} , correspondem as absorvâncias de 470, 665 e 652 (nm), respectivamente; Carotenoide é a concentração de carotenoides totais (mg m^{-2}); V_e é o volume do solvente utilizado (metanol) e S é a área da amostra de biofilme obtida para análise (m^2).

As absorvâncias de 470, 665 e 652 foram corrigidas para turbidez pela subtração da absorvância a 750 nm. As análises foram realizadas em duplicatas e os resultados também foram cruzados com a concentração de STV a fim de determinar a produção ($\text{mg g biofilme}^{-1}$) e produtividade ($\text{mg g biofilme}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) de carotenoides, baseados no peso seco do biofilme.

7.2.4.4 Componentes bioquímicos da biomassa aderida

Amostras compostas de biomassa seca e macerada (conforme descrito na Seção 7.2.4.4) foram utilizadas para determinar o teor de carboidratos, lipídeos, proteínas e cinzas. Os carboidratos foram determinados a partir do método de hidrólise ácida quantitativa da biomassa (HOEBLER et al., 1989), seguido pelo método do reagente fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e lido em espectrofotômetro (490 nm), usando curva padrão de glicose. A proteína foi mensurada, indiretamente, através do N total mensurado no método de NTK (APHA, método 4500-Norg C) e o fator de conversão de N para proteína de 6,25 (ZHONG et al., 2012). Os lipídeos neutros foram extraídos no determinador de gordura (Tecnal TE-044-8/50) por seis horas, utilizando o hexano 99% como solvente. Após, os lipídios de membranas foram extraídos com etanol 96% por três horas. Ambos foram quantificados por gravimetria e sua soma corresponde ao teor de lipídeos totais. Como os lipídeos neutros são de grande interesse energético, seus resultados foram cruzados com os dados de STV a fim de determinar a produtividade lipídica. Por fim, o teor de cinzas foi determinado a partir da combustão da biomassa em mufla a 550 ° C por 3 horas, sendo quantificado pela diferença de peso antes e após essa etapa.

7.2.5 Análise estatística

Os tratamentos foram realizados com duplicatas experimentais de forma independente. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software Minitab®17 e os resultados de produção de biomassa, carotenoides e composição bioquímica foram comparados por análise de variância, seguida pelo teste de média de Tukey a 5% de erro de probabilidade. O desvio padrão foi representado nas figuras como barra de erro.

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Caracterização das condições ambientais e tratamento de esgoto doméstico

Os valores médios da RFA (APÊNDICE C e D) até o 36º dia e durante toda a operação foram de 1328,6 e 1237,8 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$, respectivamente. Os valores da RFA se mantiveram, predominantemente, acima de 500 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ até 36º dia do experimento (último dia de operação dos reatores do T2). Após, devido a mudança de

estação do ano (início do verão no 29º dia de experimento), eventos de chuvas se tornaram mais frequentes, o que refletiu em dias com RFAs mais baixas, atingindo o valor mínimo de $152,4 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ (44º dia).

As temperaturas médias do meio de cultivo de diferentes tratamentos se mantiveram próximas, com valores de 27,6 (0,2), 28,2 (0,2) e 27,7 (0,1) °C para T1, T2 e T3, respectivamente. Foram observadas temperaturas mínimas e máximas em torno de 20,85 °C e 32,90 °C para todos os reatores. Para o pH, houve maior variação entre os tratamentos, no qual os valores médios foram de 7,58 (0,9), 10,37 (0,3) e 9,05 (0,7) para T1, T2 e T3, respectivamente. Esse resultado sugere que maior atividade fotossintética ocorreu no T2. Como sua operação cessou imediatamente antes do período com chuvas mais frequentes, os valores de RFA podem ter sido mais favoráveis para justificar o comportamento observado. Ao longo do experimento, os valores de pH variaram de 5,70 (0,4) a 9,51 (0,8), no T1, 8,85 (0,07) a 11,29 (0,2), no T2, e 6,1 (0,2) a 10,92 (0,2), no T3.

A respeito do OD, o T2 também apresentou maior valor médio de concentração de OD ($10,24 \text{ mg L}^{-1}$ com desvio padrão = 0,4) do que o T1 ($8,95 \text{ mg L}^{-1}$ com desvio padrão = 0,4) e T3 ($9,53 \text{ mg L}^{-1}$ com desvio padrão = 0,2). Apesar das diferentes concentrações de OD, em todos os tratamentos foram observadas concentrações mínimas em torno de 8 mg L^{-1} e saturações, cujos percentuais se mantiveram acima de 111 %. Dessa forma, houve um incremento de OD no esgoto tratado, uma vez que a concentração média de OD do esgoto doméstico era de $4,0 (1,1) \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 7.2).

Apesar das variáveis sugerirem maior atividade fotossintética no T2, a performance dos reatores para remoção de nutrientes (N-NH_4^+ e Ps) não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 7.2). Remoções em torno de 97,5% foram observadas para o N-NH_4^+ . Existem várias vias para remoção de N passíveis de ocorrer no tratamento baseado no consórcio bacteriano-microalgal. Desse modo, ainda que a adoção de maior período de colheita retenha biomassa no reator e, possivelmente, favoreça a assimilação de nutrientes, o N também pode ser removido por outra via como, por exemplo, a volatilização. Houve condições favoráveis de pH e temperatura para volatilização de N em todos os tratamentos, embora, no T2, o pH tenha se mantido acima de 9 em maior parte do experimento, quando comparado aos demais tratamentos.

Tabela 7.2 – Concentrações do esgoto antes e após o tratamento e eficiências de remoção de variáveis de qualidade da água (valores médios, desvio padrão apresentado em parênteses, n =2).

Variável	Esgoto doméstico	T1		T2		T3	
		Concentração ^a (mg L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)	Concentração ^a (mg L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)	Concentração ^a (mg L ⁻¹)	Eficiência de remoção (%)
pH	7,78 (0,6)	7,58 (0,89)	-	10,37 (0,27)	-	9,05 (0,7)	-
OD	4,0 (1,1)	8,95 (0,40)	-	10,24 (0,38)	-	9,53 (0,31)	-
DQOs	382,2 (73,0)	349,4 (2,3)	8,6 ^a (0,8)	349,0 (19,4)	8,7 ^a (7,2)	342,7 (14,0)	10,3 ^a (5,2)
Ps	8,9 (0,9)	4,9 (0,9)	44,9 ^a (14,0)	2,5 (0,2)	72,0 ^a (2,6)	3,6 (0,7)	60,2 ^a (10,7)
N-NH ₄ ⁺	64,6 (4,5)	2,8 (1,6)	95,7 ^a (3,4)	0,5 (0,1)	99,2 ^a (0,2)	1,4 (0,5)	97,8 ^a (1,2)
N-NO ₃ ⁻	3,5 (5,3)	52,0 (3,7)	-1396,4	33,0 (4,0)	-849,6	37,7 (2,7)	- 983,9

Nota: Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; os números com a mesma letra na linha não diferiram estatisticamente.

^aConcentração para as variáveis OD, DQOs, Ps, N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻.

A concentração de N-NO_3^- aumentou em todos os tratamentos, indicando que o processo de nitrificação ocorreu. Observou-se maior concentração média de nitrato no T1 de 52 mg L^{-1} . Como valores de pH dos reatores do T1 se mantiveram mais baixos, é possível que tenha ocorrido menos volatilização, o que tornou o N-NH_4^+ mais disponível para que ocorresse nitrificação nesse tratamento. Apesar disso, de acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa para os percentuais de incremento dessa variável.

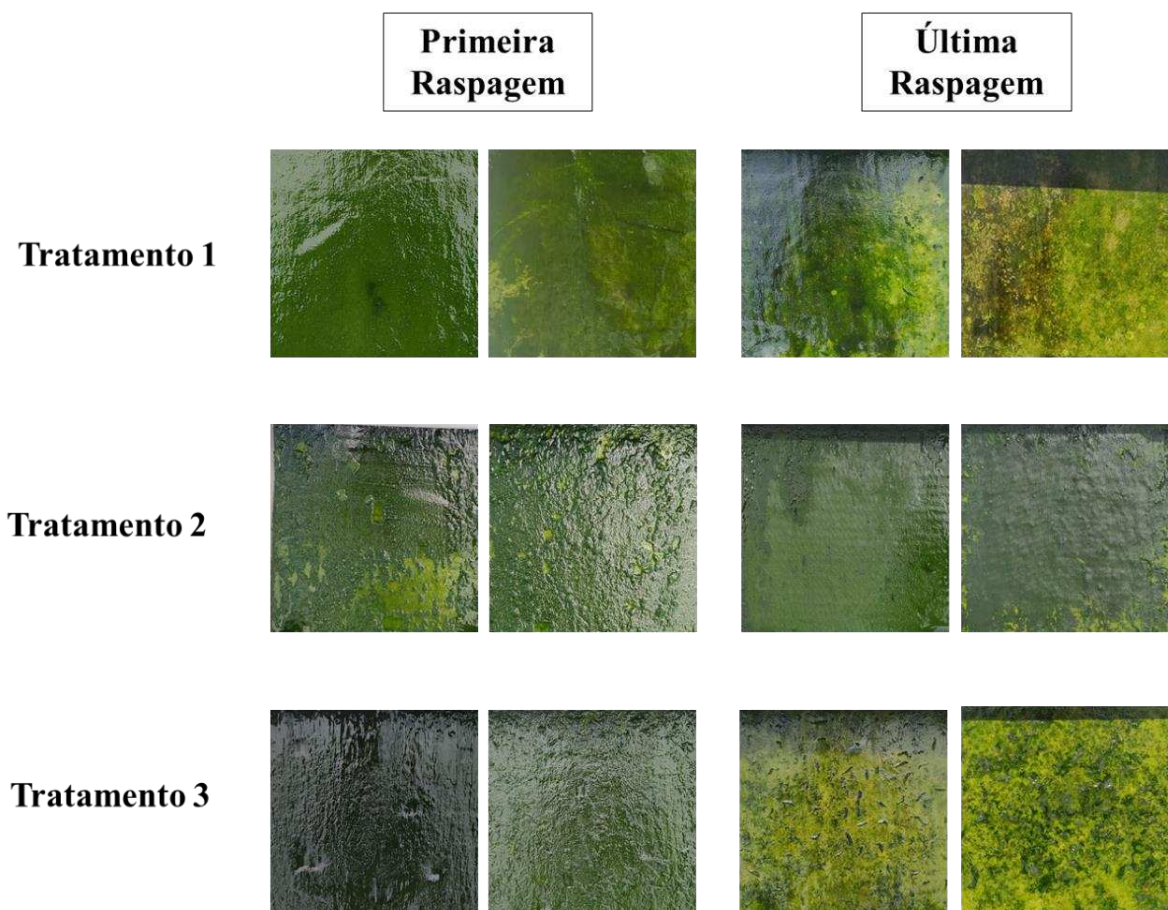
BOELEE et al. (2014) investigaram o cultivo de microalgas e o tratamento de águas residuárias municipais (efluente sintético com N-NO_3^- como única fonte de N) em um RB em condições *outdoor* em regime contínuo. Os autores observaram um padrão no qual as concentrações de nitrato e fosfato reduziam rapidamente após a colheita, atingiam um valor mínimo e, após, aumentavam novamente. Os autores também demonstraram que com a colheita parcial (aproximadamente da metade do biofilme) é possível manter as concentrações de nitrato e fosfato mais baixas ao longo da operação do que aquelas observadas durante a colheita total do biofilme. Esses resultados sugerem que, o método de colheita pode ser tão importante quanto a frequência para alcançar bom desempenho do tratamento de águas residuárias.

As concentrações de DQOs se mantiveram altas, requerendo uma etapa anterior para remoção de matéria orgânica para atender a legislação a nível estadual (Minas Gerais) de 180 mg L^{-1} para demanda química de oxigênio total (COPAM, 2008). A eficiência de remoção de DQOs se mostrou baixa (em torno de 9%). Esse resultado pode estar associado ao TDH adotado. ASSIS et al. (2020) avaliaram um sistema híbrido com esgoto doméstico com características próximas daquelas encontradas no esgoto doméstico do presente estudo e verificaram que, em TDH de 10 dias, ocorreu uma eficiência de remoção demanda química de oxigênio total de 58,8%. Além disso, esse resultado ressalta a adequação desse sistema para o tratamento terciário. De acordo com as concentrações de Ps observadas, é necessária outra etapa de tratamento para atingir o limite de fósforo total estabelecido pelo padrão europeu (COMISSÃO EUROPEIA, 1991). Por outro lado, a concentração de N-NH_4^+ atende aos padrões de lançamento estabelecidos em normas brasileira (CONAMA, 2011) e europeia de (COMISSÃO EUROPEIA, 1991).

7.3.2 Crescimento do biofilme

No primeiro dia de colheita (12^o dia de operação), foi realizada análise de STV em todos os reatores e o resultado indicou que não havia diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Dessa forma, o crescimento dos biofilmes até o início das raspagens era, estatisticamente, igual e os demais resultados de produção da biomassa iriam refletir os efeitos dos períodos de colheita avaliadas e das condições ambientais. A Figura 7.2 apresenta os biofilmes imediatamente antes da colheita, para cada tratamento, na primeira e última raspagem. É possível observar uma nítida diferença do crescimento do biofilme de cada tratamento na primeira raspagem. Na segunda raspagem, contudo, o crescimento do T3 foi comprometido devido as baixas radiações o qual ficou exposto em quase metade do tempo do seu ciclo de crescimento. A formação do biofilme do T1 também foi afetada, mas em menores proporções.

Figura 7.2 – Biofilme formado em 12 (tratamento 1), 18 (tratamento 2) e 24 (tratamento 3) de dias de cultivo.



Confrontando as concentrações de STV de cada tratamento, foi observado que em período de colheita com maior intervalo (18 e 24 dias) oferecem maior concentração, quando comparado a colheita realizada em 12 dias (Tabela 7.3). Além disso, a produtividade de STV do T2 foi significativamente maior do que a do T1, enquanto a produtividade de clorofila-a do T3 foi significativamente maior do que a do T3 ($p < 0,05$). GROSS et al. (2013) observaram que, para um RB rotativo, maior período de colheita (10 dias) refletia em maior concentração de biomassa (cerca de 20 g m^{-2}), mas que, por outro lado, o período de colheita de 7 dias resultava em maior produtividade (cerca de $2,5 \text{ g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

Similarmente, de acordo com as concentrações de clorofila-a observadas, maior período de colheita se mostrou mais vantajosa. Ficou claro que o T3 tanto em termos de concentração, quanto de produtividade de clorofila-a é mais vantajoso que o T1. Já foi demonstrado que, à medida que o biofilme se torna mais espesso, há uma diminuição na penetração de luz e transferência de CO_2 no biofilme (GROSS et al., 2013). SCHNURR; ESPIE; ALLEN (2014) apontaram que, para biofilmes de 600 – 900 μm , mais de 75% do biofilme estava em condições de quase escuridão, o que pode ter contribuído para que o crescimento fotoautotrófico cessasse ou diminuísse drasticamente. Dessa forma, em camadas mais internas do biofilme haveria biomassa na fase estacionária de crescimento, enquanto as células da superfície estariam fotossinteticamente ativas e altamente produtivas (SCHNURR; ESPIE; ALLEN, 2014). No presente estudo, dentro das condições avaliadas, os resultados sugerem que o espessamento não foi suficiente a ponto de reduzir a produtividade de seres fotossintetizantes (com base nos valores de clorofila-a) e que, maior período de colheita, permitiu maior crescimento desses microrganismos. Por outro lado, como as condições de cultura podem provocar uma variação do teor de clorofila nas células das algas (KARAM et al., 2021), há possibilidade de que tenha ocorrido um aumento nesse teor diante da limitação da radiação.

No T3 houve concentração de 2,7 e 3,5 maior de STV e clorofila-a, respectivamente, quando comparado ao T1. As concentrações de biofilme no T2 e T3 não foram significativamente diferentes, com exceção para a produção de clorofila-a, que foi maior para T3. Ainda assim, considerando a produtividade de biomassa total, os tratamentos podem ser considerados estatisticamente iguais.

Tabela 7.3 – Produção de biomassa (n=2, desvios padrões foram apresentados em parênteses).

Tratamento	Concentração (g m ⁻²)		Produtividade (g m ⁻² dia ⁻¹)	
	STV	Clorofila-a	STV	Clorofila-a
T1	18,1 ^b (3,6)	0,2 ^b (0,003)	1,5 ^b (0,3)	0,019 ^b (0,0003)
T2	43,0 ^a (0,9)	0,4 ^b (0,06)	2,4 ^a (0,05)	0,022 ^{ab} (0,0034)
T3	48,1 ^a (0,03)	0,7 ^a (0,05)	2,0 ^{ab} (0,001)	0,031 ^a (0,0019)

Nota: Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; os números com a mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente.

A produtividade de STV no T2 e T3 foram próximas às reportadas para biofilmes colhidos, integralmente, em intervalos de 22 – 29 dias (BOELEEE et al., 2014), mas também para biofilme colhido em 6 dias (CHOUDHARY et al., 2017). Ambos resultados foram obtidos em cultivo sintético. Por outro lado, os valores de produtividades de STV e clorofila-a de todos os tratamentos foram menores daqueles reportados por ASSIS et al. (2020) para biofilme cultivado em esgoto doméstico e colhido a cada 21 dias, onde foram observadas produtividade de STV e clorofila-a de 3,25 g m⁻² dia⁻¹ e 0,08 g m⁻² dia⁻¹, respectivamente.

7.3.3 Produção de bioprodutos no biofilme

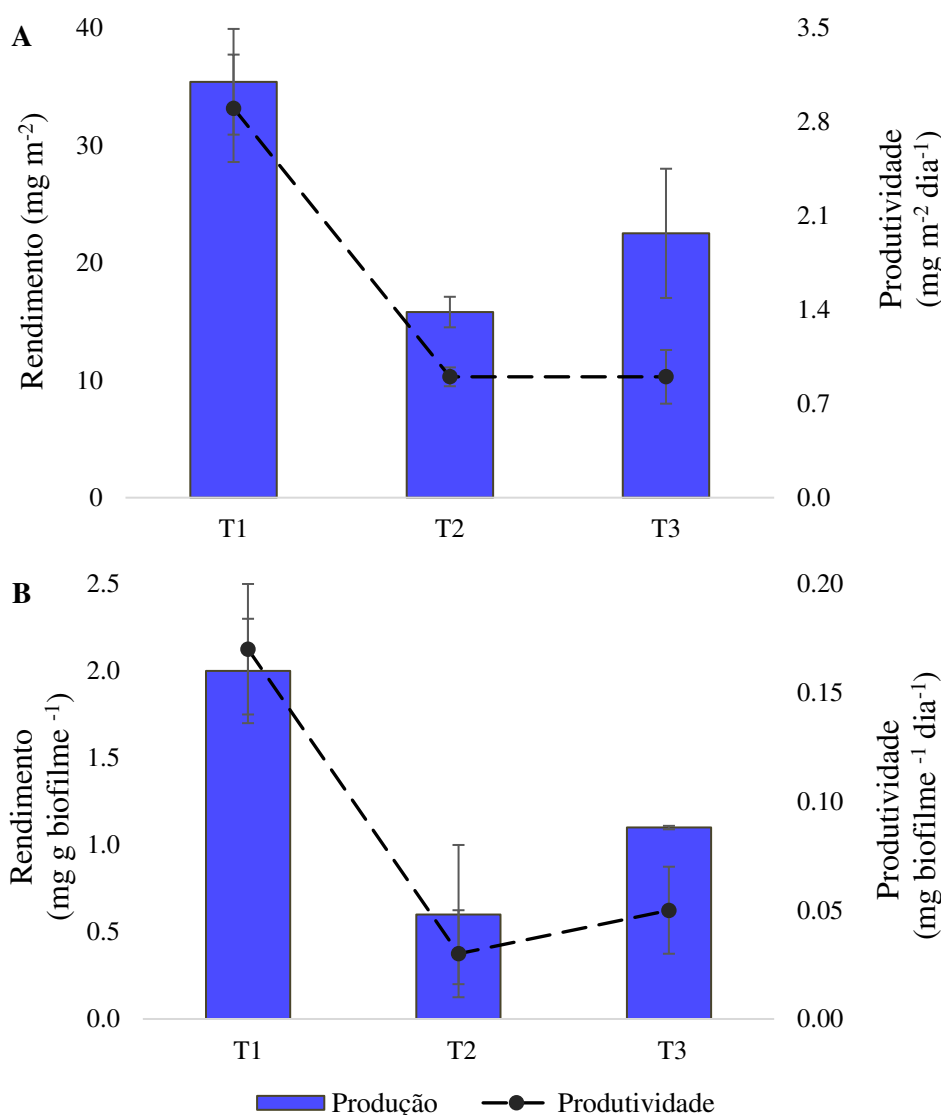
7.3.3.1 Carotenoides

O rendimento de carotenoides totais no biofilme do T1 foi de 35,4 (4,5) mg m⁻² contra 15,8 (1,3) g m⁻² e 22,5 (5,5) mg m⁻² do T2 e T3, respectivamente (Figura 7.3 A). Houve diferença significativa entre os valores encontrados, no qual o T1 foi maior que T2 e T3, mas os dois últimos foram considerados iguais, de acordo com o teste de média de Tukey ($\alpha = 0,05$). As produtividades de carotenoides foram de 2,9 (0,2), 0,9 (0,07) e 0,9 (0,2) mg m⁻² dia⁻¹ para T1, T2 e T3, respectivamente, e mesmo resultado estatístico, daquele apresentado para o rendimento, foi encontrado.

Considerando o conteúdo de carotenoides totais no biofilme (Figura 7.3b), foram encontrados rendimentos de 2,0 (0,3), 0,6 (0,4) e 1,1 (0,01) mg g biofilme⁻¹ (com base no peso seco). O rendimento (mg g biofilme⁻¹) e a produtividade (mg g biofilme⁻¹ dia⁻¹) de carotenoides do T1 foi, estatisticamente, maior do que aqueles encontrados nos T2 e T3. Dessa forma, dentro das condições avaliadas, todos os resultados indicam que realizar colheita em menor intervalo de tempo contribui com maior

potencial para recuperação de carotenoides. Para biofilme bacteriano (*Rhodococcus sp.* SD-74), foi observado um efeito contrário ao aqui reportado, visto que ocorreu aumento da concentração de carotenoides intracelulares ao longo do desenvolvimento do biofilme (ZHENG et al., 2013). Para as microalgas, a maioria das espécies de microalgas contém de 0,1 – 0,2% (SIDDIKI et al., 2022). No presente estudo, maior produção de biomassa não refletiu em maior rendimento de carotenoides.

Figura 7.3 – Rendimento (eixo a esquerda) e produtividade (eixo a direita) de carotenoides por (a) área e (b) STV do biofilme (n = 2, barras verticais representam o desvio padrão).



Dentre os fatores que interferem na produção de pigmentos de microalgas, o seu estímulo devido ao estresse nutricional (de nitrogênio) e aumento da intensidade de luz já é conhecido (GOUVEIA et al., 2014; PANCHA et al., 2014). Todos os

tratamentos foram submetidos as mesmas cargas de N e condições ambientais. Contudo, ainda que a intensidade de luz externa seja suficiente, ela não representa a intensidade de luz recebida pelas microalgas ao longo da profundidade do biofilme, especialmente em cultivo de biofilme de longo prazo, ou seja, aqueles onde ocorre maior espessamento (YU et al., 2022). A transmissão de luz é dificultada pelo efeito de sombreamento das células de microrganismos e também do EPS, o que limita a capacidade fotossintética das algas a uma determinada profundidade do biofilme (YU et al., 2022). Assim, ao mesmo passo que pode ocorrer fotoinibição em camadas superiores, também pode ocorrer deficiência de luz em camadas mais profundas do biofilme.

Dessa forma, de acordo com os relatos apontadas na literatura, acredita-se que, devido as diferentes espessuras dos biofilmes (como observado na Figura 7.2), a variação da intensidade de luz ao longo de seu perfil pode explicar as diferentes produtividades de carotenoides aqui encontradas. No T1 foram formados biofilmes menos espessos, em contrapartida, ocorreu maior produção de carotenoides. Como no T3, durante a segunda raspagem, também houve menor formação de biofilme, quando comparada a sua primeira raspagem e aos biofilmes do T2, a sua produção de carotenoides foi maior do que a observada no T2. Ainda assim, considerando os valores médios obtidos no experimento, não houve diferença significativa entre as produções de carotenoides no T2 e T3.

Além disso, GOUVEIA et al. (2014) reportaram que o aumento da intensidade de luz no cultivo de *Chlorella vulgaris* provocou redução de clorofilas e, por outro lado, aumento de outros tipos de pigmentos como os carotenos e outros. Uma tendência semelhante foi observada no presente estudo, uma vez que produtividade de clorofila-a do T1 (que proporcionou maior exposição das células à radiação solar) foi significativamente menor do que a reportada para o T3 (Tabela 7.3). Isso ocorre porque carotenoides secundários agem como resposta a fotoproteção das microalgas sob alto estresse luminoso, uma vez que atuam como agentes protetores dos centros de reação fotossintética (GOUVEIA et al. 2014). A fotoproteção pode ocorrer pela dissipação de energia em excesso nos tilacóides e também por meio da criação de uma camada de proteção solar de gotículas de óleo ricas em carotenoides (como carotenos, xantofilas e astaxantina) na periferia do cloroplasto ou do corpo celular (VARELA et al., 2015). A fotoinibição em várias espécies de microalgas pode ocorrer entre 100 a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (HILLMAN; SIMS, 2020). Estudos futuros podem se

dedicar a compreender melhor as relações entre as características físico-químicas do biofilme e a intensidade de luz e entender esses efeitos sob o metabolismo das microalgas.

O potencial de produção de carotenoides da microalga *Phormidium autumnale* em efluentes agroindustriais já foi previamente relatado RODRIGUES et al. (2014). Os autores encontraram produção de carotenoides totais de 183,03 $\mu\text{g g biomassa}^{-1}$ (0,183 $\text{mg g biomassa}^{-1}$), que corresponde a um valor próximo, porém menor, ao observado no T1. Um fator que pode ajudar a explicar a diferença entre os resultados é o tipo de método de cultivo, uma vez que no estudo de RODRIGUES et al. (2014) a biomassa foi cultivada em fotobiorreator coluna de bolhas. Dessa forma, à medida que o biofilme se espessa ele sofre maior efeito de sombreamento quando comparado ao cultivo suspenso. Concentração de 2,45 $\text{mg g biomassa}^{-1}$ de carotenoides (composto por β -caroteno, luteína e violaxantina) em *Tetraselmis chuii* cultivados em sistema suspenso foi relatada anteriormente na literatura (GANGADHAR et al., 2016).

7.3.3.2 Componentes bioquímicos

O teor de proteínas, carboidratos, cinzas lipídeos neutros e de membrana não variaram significativamente entre os tratamentos (Tabela 7.4). Em todos os tratamentos houve maior produção de proteínas (em torno de 27,8%), similar ao que foi observado para biofilmes cultivados em esgoto doméstico (FERREIRA et al., 2020), e efluentes de bovinocultura (CHOUDHARY et al., 2017). Contudo, foi menor do que o reportado para biofilme de *C. vulgaris* UTEX 2714 cultivado em águas residuárias de suinocultura (previamente diluída) em fotobiorreator de membrana (WU et al., 2019).

Tabela 7.4 – Teor de proteínas, carboidratos e cinzas (desvio padrão apresentado entre parênteses).

Componente bioquímico	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)
Proteínas	28,3 ^a (0,9)	27,1 ^a (1,2)	28,0 ^a (1,8)
Lipídeos neutros	5,4 ^a (0,3)	4,7 ^a (1,1)	7,2 ^a (2,7)
Lipídeos de membrana	13,3 ^a (0,7)	9,8 ^a (5,9)	12,9 ^a (0,3)
Carboidratos	8,9 ^a (2,0)	10,1 ^a (5,5)	12,1 ^a (8,8)
Cinzas	6,6 ^a (0,8)	6,7 ^a (1,7)	6,2 ^a (0,4)

Nota: Significativo a nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; os números com a mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente.

Biomassa com maior conteúdo de proteínas tem sido, comumente, recomendadas para aplicação na suplementação animal (CHOUDHARY et al., 2017), contudo, outros fatores que interferem na palatabilidade e necessidades nutricionais dos animais devem ser consideradas, bem como sua segurança alimentar. Os carboidratos são, comumente, valorizados por meio de rotas para produção de bioenergias, como bioetanol, biogás e *hydrochar*. O teor de carboidratos aqui encontrado foi próximo ao reportado na biomassa cultivada em efluente agroindustrial reportado por CASTRO et al. (2021), que foi utilizada para a produção de *hydrochar* via carbonização hidrotérmica. Acredita-se que essa poderia ser uma possível rota de valorização da biomassa aderida obtida no presente estudo, contudo, seria mais interessante se maior teor de carboidratos tivesse sido obtido.

A produtividade lipídica encontrada foi menor do que a reportada por (GENIN; AITCHISON; ALLEN, 2014) e revela a oportunidade de investigar estratégias para o aumento da produtividade lipídica da biomassa aderida produzida em águas residuárias. SHEN et al., (2015) aumentaram o conteúdo lipídico de um biofilme de *Botryococcus braunii* de 11,6 a 42,3 – 51,3% ao adotar pós-cultivo com e sem nitrogênio e EPS. Mais recentemente, YE et al. (2018) demonstraram aumento do teor e rendimento lipídico de biofilme de *Chlorella vulgaris* no crescimento fotoautotrófico assistido por heterotrófico contra o fotoautotrófico.

7.3.4 Implicações para definição do período de colheita e considerações sobre o efeito de ampliação de escala sob a perspectiva de recuperação de bioprodutos

Os reatores de cultivo aderido, por si só, já trazem a vantagem de tornar a etapa de colheita mais simples e oferecer maior recuperação da biomassa colhida quando comparada a outras técnicas (FERREIRA et al., 2020). Esse campo de pesquisa ainda é considerado novo e, apesar de ainda requerer melhorias, sua produtividade e desempenho se mostram promissores para um empreendimento lucrativo no futuro (XU et al., 2020).

O período de colheita é um parâmetro que afetará a rotina de operação do RB. Em termos econômicos, os custos associados ao consumo energético (se adotada colheita mecânica) e de mão-de-obra (especialmente se adotada colheita manual) serão afetados. Paralelo a isso, a gestão da biomassa gerada também é influenciada. Os resultados aqui encontrados demonstraram que, para obter maior

produtividade de biomassa, para aplicação no solo como biofertilizante, por exemplo, maior período de raspagem deve ser adotado. Por outro lado, se o objetivo for alcançar maior produtividade de carotenoides, biofilmes menos espessos e, portanto, raspados em maior frequência, precisam ser colhidos.

Considerando o contexto das estações de tratamento de águas residuárias, o seu porte pode contribuir para a escolha da melhor rota de valorização da biomassa. Em estações muito pequenas, as baixas produções podem tornar inviável economicamente a comercialização do produto, ainda que ele tenha alto valor agregado. Isso ocorre, pois os processos após a etapa de colheitas podem ser caros e requerer altas tecnologias. Além disso, para se obter uma extração bem-sucedida de produtos de alto valor, é necessário colher uma quantidade significativa de biomassa (SIDDIKI et al., 2022).

O aproveitamento de carotenoides em uma abordagem de biorrefinaria pode ser promissor, pois esses produtos bioquímicos são de alto valor, o que aumenta as chances de produção comercial em larga escala (GANGADHAR et al., 2016). São esperadas boas projeções para produção comercial de produtos químicos de alto valor agregado advindos do cultivo sintético, pois, apesar de seus custos unitários de produção serem altos, eles resultam em altas receitas (VUPPALADADIYAM et al., 2018). Contudo, como esses bioprodutos, incluindo os aqui investigados, são aplicáveis a suplementação animal/humana ou como ingredientes de produtos que serão futuramente consumidos por estes. Assim, recomenda-se estudos prévios para avaliar a segurança do seu uso, uma vez que sua biomassa advém de águas residuárias. Além disso, a aceitação desses produtos pela população ainda é uma incógnita.

Outro ponto importante e que pode ser mais bem investigado em estudos futuros é a variação da produtividade dos bioprodutos conforme as mudanças sazonais das condições ambientais. Mesmo para o T1, a produção de carotenoides foi maior na primeira raspagem do que aquela da última raspagem (dados não apresentados), nos quais os valores de RFA foram menores. Dessa forma, existe a possibilidade de que, sazonalmente, uma ou outra rota de valorização seja mais vantajosa. Assim, existem variados cenários para o aproveitamento de biomassa e carotenoides que podem ser mais bem compreendidos do ponto de vista técnico, econômico, ambiental e social.

Ainda serão necessários esforços para a popularização e aproveitamento de bioprodutos, em escala real, de biomassa produzida em águas residuárias. Contudo, há forte expectativa de que ETAR, além de exercer seu papel convencional, contribua para recuperação de energia e nutrientes (COROMINAS et al., 2020).

7.4 Conclusões

O período de colheita provocou efeitos diferentes nos parâmetros avaliados. Não foram observadas diferenças significativas no tratamento no esgoto doméstico. Por outro lado, maior período de colheita resultou em maiores concentrações e produtividades de biomassa, enquanto menor período de colheita avaliada (12 dias) contribuiu para maior rendimento e produtividade de carotenoides totais. Acredita-se que os resultados encontrados estão fortemente relacionados a penetração de luz no perfil do biofilme ao longo de sua formação. Dessa forma, estudos futuros podem se dedicar a compreender melhor como diferentes intensidades de luz espessuras do biofilme afetam o metabolismo das microalgas.

7.5 Referências

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. **APHA-AWWA-WEF**, Washington, DC. 2012.
- ASSIS, L. R. et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.
- ASSIS, L. R. et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. January, p. 101440, 2019.
- ASSIS, L. et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. April, p. 111183, 2020.
- BOELEEE, N. C. et al. The effect of harvesting on biomass production and nutrient removal in phototrophic biofilm reactors for effluent polishing. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1439–1452, 2014.

CASTRO, J. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications. **Science of the Total Environment**, v 768, 144480, 2021.

CHOUDHARY, P. et al. Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 276–284, 2017.

CHRISTENSON, L. B.; SIMS, R. C. Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 7, p. 1674–1684, 2012.

COMISSÃO EUROPEIA, 1991. *COUNCIL DIRECTIVE 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment*. Disponível em https://ec.europa.eu/environment/water/water-urbanwaste/legislation/directive_en.htm.

CONAMA, 2011. Resolução CONAMA N° 430 de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

COPAM, 2008. Resolução COPAM/CERH-MG N° 01 of 05 May 2008. Dispõe sobre a Classificação de Corpos de Água e Diretrizes Ambientais para sua classificação, bem como estabelece as Condições e Padrões para Descarte de Efluentes e dá outras providências. Disponível em <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=8151>.

COROMINAS, L. et al. The application of life cycle assessment (LCA) to wastewater treatment: A best practice guide and critical review. **Water Research**, v. 184, 2020.

COUTO, E. et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, 2015.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMAN, P. Biomass production in high rate ponds and hydrothermal liquefaction: Wastewater treatment and bioenergy integration. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method form determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, 350–356, 1956.

HILLMAN, K. M.; SIMS, R. C. Struvite formation associated with the microalgae biofilm matrix of a rotating algal biofilm reactor (RABR) during nutrient removal from municipal wastewater. **Water Science and Technology**, v. 81, n. 4, p. 644–655, 2020.

HOEBLER, C. et al. Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 360 – 367, 1989.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

GANGADHAR, K. N. et al. Microalgae-based unsaponifiable matter as source of natural antioxidants and metal chelators to enhance the value of wet *Tetraselmis chuii* biomass. **Open Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 299–307, 2016.

GENIN, S. N.; STEWART AITCHISON, J.; GRANT ALLEN, D. Design of algal film photobioreactors: Material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 136–143, 2014.

GOUVEIA, L. et al. Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a Photosynthetic Alga Microbial Fuel Cell. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 171–177, 2014.

GROSS, M. et al. Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. **Bioresource Technology**, v. 150, p. 195–201, 2013.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 525–534, 2010.

KARAM, A. L. et al. Chlorophyll a and non-pigmented biomass are sufficient predictors

for estimating light attenuation during cultivation of *Dunaiella viridis*. **Algal Research**, v. 55, 102283, 2021.

LEE, S. H. et al. Higher biomass productivity of microalgae in an attached growth system, using wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1566–1573, 2014.

LI, K. et al. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. **Bioresource Technology**, v. 291, n. June, p. 121934, 2019.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 350-382, 1987.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 3187–3201, 2019.

MARKER, A.F.H., et al. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusion and recommendations. **Arch. Hydrobiol. Beih.** 14, 91–106, 1980.

NAGARAJAN, D. et al. Resource recovery from wastewaters using microalgae-based approaches: A circular bioeconomy perspective. **Bioresource Technology**, v. 302, n. January, p. 122817, 2020.

PANCHA, I. et al. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.

PORRA, R.J. A simple method for extracting chlorophylls from the recalcitrant alga, *Nannochlorisatomus*, without formation of spectroscopically-different magnesium-rhodochlorin derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. 1019 (1990) 137–141.

PODOLA, B.; LI, T.; MELKONIAN, M. Porous Substrate Bioreactors: A Paradigm Shift in Microalgal Biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 121–132, 2017.

RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. **Food Research International**, v. 65, n. PB, p. 144–148, 2014.

SARTORY, D.P.; GROBBELAAR, J.U. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, p. 177–187, 1984.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. Algae biofilm growth and the potential to stimulate lipid accumulation through nutrient starvation. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 337–344, 2013.

SCHNURR, P. J.; ESPIE, G. S.; ALLEN, D. G. The effect of light direction and suspended cell concentrations on algal biofilm growth rates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 20, p. 8553–8562, 2014.

SHEN, Y. et al. Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 3, p. 441–450, 2014.

SHEN, Y. et al. Biofilm formation and lipid accumulation of attached culture of *Botryococcus braunii*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 481–488, 2015.

SIDDIKI, S. Y. A. et al. Microalgae biomass as a sustainable source for biofuel, biochemical and biobased value-added products: An integrated biorefinery concept. **Fuel**, v. 307, n. September 2021, p. 121782, 2022.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Development and Applications of Attached Growth System for Microalgae Biomass Production. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 3, p. 709–722, 2021.

SCHWARZBOLD, A., BURLIGA, A.L., TORGAN, L.C., 2013. Ecologia Do Perífiton. RiMa Editora, São Carlos ([in Portuguese]).

VARELA, J. C. et al. Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. **Photosynthesis Research**, v. 125, n. 3, p. 423–436, 2015.

VUPPALADADIYAM, A. K. et al. Sustainability Analysis of Microalgae Production Systems: A Review on Resource with Unexploited High-Value Reserves. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 24, p. 14031–14049, 2018.

WANG, J. H. et al. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. April, p. 331–342, 2018.

WU, X. et al. A novel algal biofilm photobioreactor for efficient hog manure wastewater utilization and treatment. **Bioresource Technology**, v. 292, n. July, p. 2–7, 2019.

XU, X. Q. et al. Attached microalgae cultivation and nutrients removal in a novel capillary-driven photo-biofilm reactor. **Algal Research**, v. 27, n. September, p. 198–205, 2017.

XU, Z. et al. Development of integrated culture systems and harvesting methods for improved algal biomass productivity and wastewater resource recovery – A review. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141039, 2020.

YE, Y. et al. Optimizing culture conditions for heterotrophic-assisted photoautotrophic biofilm growth of *Chlorella vulgaris* to simultaneously improve microalgae biomass and lipid productivity. **Bioresource Technology**, v. 270, n. August, p. 80–87, 2018.

YU, H. et al. The mechanism study of attached microalgae cultivation based on reverse osmosis concentrated water (WROC). **Resources, Conservation and Recycling**, v. 179, n. October 2021, 2022.

YU, Z. et al. Inclined algal biofilm photobioreactor (IABPBR) for cost-effective cultivation of lipid-rich microalgae and treatment of seawater-diluted anaerobically digested effluent from kitchen waste with the aid of phytohormones. **Bioresource Technology**, v. 315, n. June, 2020.

WETZEL, R. G.; LIKENS, G. E. **Limnological Analysis**. 3^a ed. New York: Springer-Verlag. 2000. 429p.

ZHANG, Q. et al. Vertical-algal-biofilm enhanced raceway pond for cost-effective wastewater treatment and value-added products production. **Water Research**, v. 139, p. 144–157, 2018.

ZHENG, Y. T. et al. Correlation of carotenoid accumulation with aggregation and biofilm development in *Rhodococcus* sp. SD-74. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 15, p. 7295–7301, 2013.

ZHONG, W. et al. Biogas productivity by codigesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source, **Bioresource Technology**, v. 114, p. 281-286, 2012.

ZHUANG, L. L.; LI, M.; HAO NGO, H. Non-suspended microalgae cultivation for wastewater refinery and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 308, n. February, p. 123320, 2020.

8. Conclusão geral

O reator de biofilme se mostrou promissor para a remoção de nutrientes do esgoto doméstico, mas não é indicado para garantir o seu tratamento a nível secundário. Apesar das altas eficiências de remoção de nitrogênio total de *Kjeldahl* e nitrogênio amoniacal total, acredita-se que recuperação de nitrogênio pelo biofilme ainda pode ser melhorada.

O presente estudo demonstrou que não houve variações no conteúdo de N do biofilme durante sua formação. Como esse parâmetro apresentou o mesmo comportamento das concentrações de clorofila-*a*, acredita-se que o crescimento de organismos fotossintetizantes é o fator que favorece a recuperação de N no biofilme. Com relação a comunidade de microalgas, a *Chlorella vulgaris* se manteve como espécie mais abundante durante o acompanhamento da formação do biofilme.

O RB proporcionou boas remoção de N, porém o seu potencial de recuperação por meio de biofilme permaneceu baixo. Por outro lado, em colheitas realizadas em 12 dias seria possível obter maior produtividade de carotenoides, enquanto em colheitas com maior intervalo garantem maior produtividade de biomassa.

9. Sugestões para pesquisas futuras

Os resultados dessa pesquisa mostraram que, ao longo da formação do biofilme, podem existir estratégias de colheitas que permitam a otimização da produção de certos produtos. Dessa forma, recomenda-se que estudos futuros avaliem novas alternativas para aumentar a recuperação de nitrogênio via seu acúmulo no biofilme. Maiores esclarecimentos das relações entre intensidades de luz e espessuras do biofilme, bem como sua influência no metabolismo das microalgas precisam ser realizados.

São necessárias investigações em escalas maiores das que utilizadas aqui para obter resultados mais próximos aqueles que seriam obtidos em escala real. Estes estudos podem incluir outros *designs* de reatores de biofilme e sistemas híbridos. Além disso, estudos voltados para NEXUS, avaliação econômica e avaliação de ciclo de vida podem ser realizados a fim de complementar os estudos técnicos de produção e aproveitamento de bioprodutos a partir de microalgas.

REFERÊNCIAS

- ASSEMANY, P. et al. Energetic valorization of algal biomass in a hybrid anaerobic reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 209, p. 308–315, 2018a.
- ASSEMANY, P. P. et al. Biodiesel from wastewater: Lipid production in high rate algal pond receiving disinfected effluent. **Water Science and Technology**, v. 71, n. 8, p. 1229–1234, 2015.
- ASSEMANY, P. P. et al. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. **Algal Research**, v. 17, p. 53–60, 2016.
- ASSEMANY, P. P. et al. Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment. **Water Science and Technology**, v. 78, n. 1, p. 12–19, 2018b.
- ASSIS, L. R. et al. Microalgal biomass production and nutrients removal from domestic sewage in a hybrid high-rate pond with biofilm reactor. **Ecological Engineering**, v. 106, p. 191–199, 2017.
- ASSIS, T. C. DE et al. Using atmospheric emissions as CO₂ source in the cultivation of microalgae: Productivity and economic viability. **Journal of Cleaner Production**, v. 215, p. 1160–1169, 2019.
- ASSIS, L. et al. Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, v. 274, n. April, p. 111183, 2020.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae biofilm in soil: Greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 1640–1648, 2017.
- CASTRO, J. DE S. et al. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 135088, 2020a.
- CASTRO, J. DE S. et al. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of the Total Environment**, v. 724, 2020b.
- CASTRO, J. DE S. et al. Hydrothermal carbonization of microalgae biomass produced

in agro-industrial effluent: Products, characterization and applications. **Science of the Total Environment**, v. 768, p. 144480, 2021.

CHOUDHARY, P. et al. Development and performance evaluation of an algal biofilm reactor for treatment of multiple wastewaters and characterization of biomass for diverse applications. *Bioresource Technology*, v. 224, p. 276–284, 2017.

COUTO, E. et al. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, 2015.

FERREIRA, J. et al. Innovative microalgae biomass harvesting methods: Technical feasibility and life cycle analysis. **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 140939, 2020.

HUANG, H. et al. Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1115–1129, 2019.

JOHNSON, M. B.; WEN, Z. Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 525–534, 2010.

LEE, S. H. et al. Higher biomass productivity of microalgae in an attached growth system, using wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1566–1573, 2014.

LORENTZ, J. F. et al. Microalgal biomass as a biofertilizer for pasture cultivation: Plant productivity and chemical composition. **Journal of Cleaner Production**, v. 276, p. 124130, 2020.

MAGALHÃES, I. B. et al. Technologies for improving microalgae biomass production coupled to effluent treatment: A life cycle approach. **Algal Research**, v. 57, n. March, 2021.

MANTZOROU, A.; VERVERIDIS, F. Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 3187–3201, 2019.

PEREIRA, A. S. A. DE P. et al. Organomineral fertilizers pastilles from microalgae grown in wastewater: Ammonia volatilization and plant growth. **Science of the Total Environment**, v. 779, 2021.

PODOLA, B.; LI, T.; MELKONIAN, M. Porous Substrate Bioreactors: A Paradigm Shift in Microalgal Biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 121–132, 2017.

SAIDULU, D.; MAJUMDER, A.; GUPTA, A. K. A systematic review of moving bed biofilm reactor, membrane bioreactor, and moving bed membrane bioreactor for wastewater treatment: Comparison of research trends, removal mechanisms, and performance. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 5, p. 106112, 2021.

SHEN, Y. et al. Influence of algae species, substrata and culture conditions on attached microalgal culture. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 3, p. 441–450, 2014.

SILVA, T. A. et al. Microalgae biomass as a renewable biostimulant: meat processing industry effluent treatment, soil health improvement, and plant growth. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2021.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Development and Applications of Attached Growth System for Microalgae Biomass Production. **Bioenergy Research**, v. 14, n. 3, p. 709–722, 2021.

SOUZA, M. H. B. DE et al. Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 211, p. 342–349, 2019.

WANG, J. H. et al. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, n. April, p. 331–342, 2018.

ZHANG, B. et al. Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 118, n. March 2019, p. 109563, 2020.

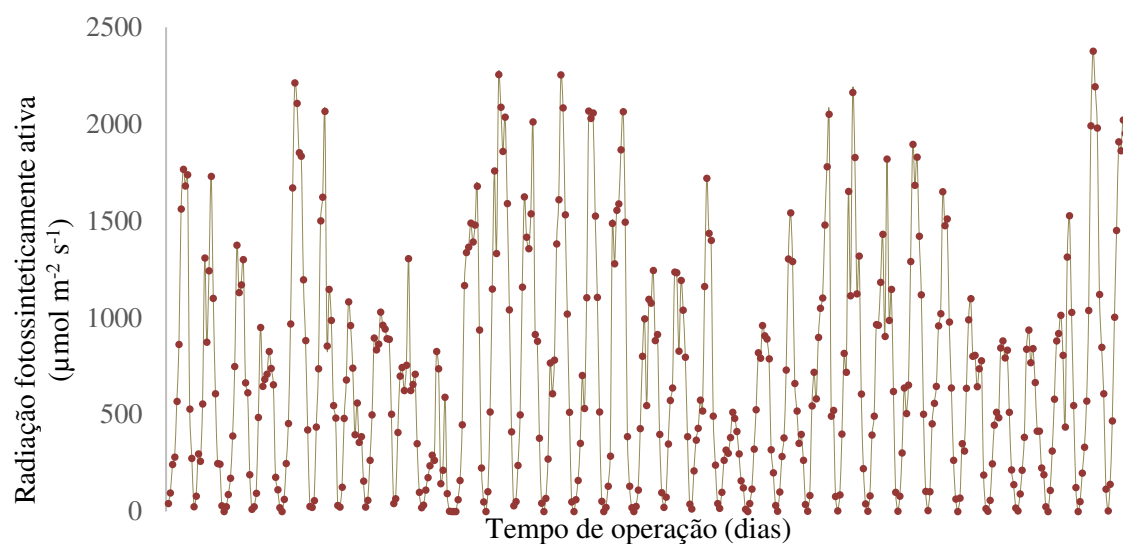
APÊNDICE A

Tabela A5.1 – Variedade de materiais estudados e comparados em pesquisas de crescimento aderido de microalgas.

Número de materiais	Tipos de materiais	Referências
1	Espuma de poliuretano	Rosli et al. (2019)
1	Folha de policloreto de vinila (PVC)	Boelle et al. (2011)
1	Espuma de policloreto de vinila (PVC)	Posadas et al. (2013)
1	Algodão	Assis et al. (2017)
8	Náilon, polipropileno, algodão, acrílico, juta, poliéster, algodão fio alto e algodão fio baixo	Christenson et al. (2012)
16	Gaze, musselina, fibra de vidro armid, fibra de vidro revestida de PTFE (Politetrafluoroetileno), tecido de camurça, vermiculita, microfibra, tecido de camurça sintética, fibra de vidro, estopa, duto de algodão, veludo, tyvek, ácido poli-láctico, ácido poli-láctico abrasivo, náilon laminado de vinil e poliéster.	Gross et al. (2013)
5	Folha de polipropileno, folha de fibra, tecido de musselina, tecido não tecido <i>spunbond</i> (TNT) e folha de filtro	Choudhary et al. (2017)
1	Concreto	Ozkan et al. (2012)
1	Chapa de policarbonato	Zamalloa et al. (2013)
1	Vidro	Schnurr et al. (2013)
1	Hastes de vidro	Tsolcha et al. (2018)
2	Policloreto de vinila (PVC - nos discos) e chapa de aço inoxidável	Sebestyén et al. (2016)
3	Algodão, poliéster, náilon	Assis et al. (2019)
1	Poliéster	Assis et al. (2020)
10	Papel de filtro comum, linho de algodão trançado, linho fino, poliéster macio, linho grosso, linho macio, algodão, náilon, gaze	Yu et al. (2020)
1	Casca de noz	Zou et al. (2021)
2	Coral veludo e poliéster	Zhang et al. (2018a)
12	Coral veludo - longo, coral veludo - curto, pleuche, linho de algodão, linho grosso, linho fino, duto de algodão, duto de poliéster-algodão, gaze, tecido não tecido (TNT), organza e seda pérola gelo	Zhang et al. (2018b)

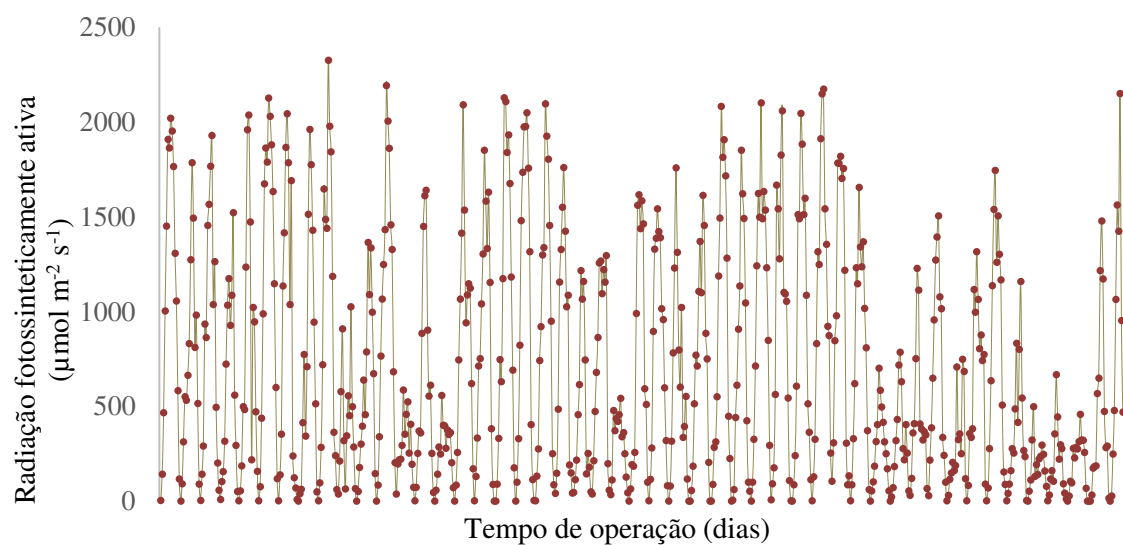
APÊNDICE B

Figura A6.1 – Valores de radiação fotossinteticamente ativa ao longo do experimento. Note: os valores se referem a medições horárias entre 08h às 21h.



APÊNDICE C

Figura A7.1 – Valores de radiação fotossinteticamente ativa ao longo do experimento. Note: os valores se referem a medições horárias entre 08h às 21h.



APÊNDICE D

Figura A7.2 – Variação da radiação fotossinteticamente ativa medida entre 12h e 14h ao longo do experimento descrito no Capítulo III.

