

RAFAEL CARVALHO NOGUEIRA DA GAMA

**BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS INDUSTRIAIS VIA
MICROALGAS: EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NA
PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS DE VALOR AGREGADO**

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

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

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

T

G184b
2022

Gama, Rafael Carvalho Nogueira da, 1993-
Biorremediação de águas residuárias industriais via microalgas: efeitos da disponibilidade de nutrientes na obtenção de bioprodutos de valor agregado / Rafael Carvalho Nogueira da Gama. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (74 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.

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

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.096>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Águas residuais - Purificação - Tratamento biológico.
2. Biorremediação. 3. Nutrientes. 4. Lagoas de estabilização.
5. Biomassa. 6. Microalgas. I. Calijuri, Maria Lúcia, 1955-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil.
III. Título.

CDD 22. ed. 628.35

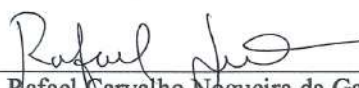
RAFAEL CARVALHO NOGUEIRA DA GAMA

**BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS INDUSTRIAIS VIA
MICROALGAS: EFEITOS DA DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NA
PRODUÇÃO DE BIOPRODUTOS DE VALOR AGREGADO**

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:



Rafael Carvalho Nogueira da Gama
Autor



Maria Lúcia Calijuri
Orientadora

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e proteção.

Aos meus pais Rômulo e Myriam e avós João e Avany pelo amor, incentivo aos estudos e apoio incondicional em minhas escolhas. Aos meus irmãos José e Duda por todo amor.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À professora Lúcia, pela orientação, atenção, exemplo, oportunidades e confiança depositada em mim.

Às minhas coorientadoras Letícia e Paula, por toda atenção e contribuições nessa jornada, e ao Professor Marcelo Henrique Otenio pela ajuda no direcionamento dessa pesquisa.

Aos membros da banca, Dr. Alberto Reis, Professora Maria do Carmo Calijuri e Professora Paula Assemany e Dra. Letícia Rodrigues de Assis por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

Ao Janderson pela ajuda na realização das análises em laboratório e pela disposição em ajudar nos momentos cruciais durante a realização do experimento.

Ao Professor Paulo Roberto Cecon pelas valiosas contribuições na avaliação dos dados produzidos nessa pesquisa.

Aos companheiros do SIGEOnPA, pela convivência e parceria, que faz o grupo crescer sempre.

À Luiza, por tudo, mas nesse texto especialmente pelos dias e noites juntos na execução do experimento, revisões de texto, e contribuições desde quando esse trabalho era apenas uma ideia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

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

“O agora é o presente mais valioso”.

RESUMO

GAMA, Rafael Carvalho Nogueira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2022. **Biorremediação de águas residuárias industriais via microalgas: efeitos da disponibilidade de nutrientes na produção de bioprodutos de valor agregado.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri.

Apesar de sua importância econômica, a indústria alimentícia é responsável por diversos impactos ambientais negativos, principalmente quando suas águas residuárias são lançadas de forma inadequada nos corpos hídricos. A biotecnologia de microalgas pode representar uma solução potencial para minimizar esses impactos, atuando na biorremediação de diversos tipos de águas residuárias e produzindo biomassa de valor agregado. No entanto, alguns gargalos ainda precisam ser superados, por exemplo, a baixa produtividade de biomassa de lagoas de algas de alta taxa (LATs). Portanto, com o objetivo de melhorar a produção de biomassa e o desempenho do tratamento de águas residuárias da indústria de alimentos, este estudo avaliou o efeito de diferentes relações C/N pela mistura de águas residuárias de cervejaria e processamento de carne durante o cultivo de microalgas em LATs. Foram avaliados meios de cultivo em condições ótimas ($C/N = 6$), déficit ($C/N < 6$) e excedente ($C/N > 6$) de carbono. O crescimento da biomassa não foi influenciado pelas condições nutricionais, tanto na produção de clorofila-*a* (0,28 - 0,33 g/m²) quanto na produção de biomassa total (4 - 5 g/m²), evidenciando a capacidade do consórcio microalga-bacteriano de se adaptar a diferentes condições. As remoções totais de carbono, nitrogênio e fósforo foram influenciadas pela disponibilidade de nutrientes. As melhores taxas de remoção de carbono, nitrogênio e fósforo foram 62% ($C/N \geq 7,4$), 59% ($C/N = 4,1$) e 58% ($C/N = 4,1$), respectivamente. As condições de déficit de carbono alcançaram melhor eficiência no tratamento, porém houve maior produção de ácidos graxos poli-insaturados quando mais carbono estava disponível. Já quanto à produtividade da biomassa microalgal e ao acúmulo de carotenoides, não houve diferença entre as condições avaliadas. Sendo assim, os resultados deste estudo apontam e debatem os pontos positivos e desafios encontrados para viabilizar a rota de aproveitamento da biomassa microalgal na suplementação animal, buscando a valorização de recursos advindos do tratamento de águas residuárias.

Palavras-chave: Disponibilidade de nutrientes. Indústria alimentícia. Águas residuais mistas. Produtividade de biomassa. Lagoas de algas de alta taxa.

ABSTRACT

GAMA, Rafael Carvalho Nogueira da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2022. **Bioremediation of industrial wastewater via microalgae: effects of nutrient availability on the production of value-added bioproducts.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri.

Despite its economic importance, the food industry is responsible for several negative environmental impacts, especially when its wastewater is improperly released into water bodies. Microalgae biotechnology may represent a potential solution to minimize these impacts, acting in the bioremediation of various types of wastewater and producing value-added biomass. However, some bottlenecks still need to be overcome, for example, the low biomass productivity of high rate algae ponds (LATs). Therefore, with the aim of improving biomass production and wastewater treatment performance of the food industry, this study evaluated the effect of different C/N ratios by mixing wastewater from brewery and meat processing during the cultivation of microalgae in LATs. Culture media under optimal conditions ($C/N = 6$), carbon deficit ($C/N < 6$) and carbon surplus ($C/N > 6$) were evaluated. The growth of the biomass was not influenced by the nutritional conditions, both in the production of chlorophyll-a (0.28 - 0.33 g/m²) and in the production of total biomass (4 - 5 g/m²), evidencing the capacity of the microalgae-bacterial consortium to adapt to different conditions. Total carbon, nitrogen and phosphorus removals were influenced by nutrient availability. The best carbon, nitrogen and phosphorus removal rates were 62% ($C/N \geq 7.4$), 59% ($C/N = 4.1$) and 58% ($C/N = 4.1$), respectively. The carbon-deficit conditions achieved better treatment efficiency, but there was a greater production of polyunsaturated fatty acids when more carbon was available. As for the productivity of microalgal biomass and the accumulation of carotenoids, there was no difference between the evaluated conditions. Therefore, the results of this study point out and discuss the positive points and challenges found to make the route of using microalgal biomass in animal supplementation feasible, seeking to value the resources arising from the treatment of wastewater.

Keywords: Nutrient availability. Food industry. Mixed wastewaters. Biomass productivity. High rate algal ponds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Variação do oxigênio dissolvido (A) e pH (B) ao meio-dia durante o período de monitoramento (n=2, as barras verticais representam o desvio padrão)..... 25
- Figura 2.** Concentração de clorofila-*a* no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e taxa de crescimento específica no pico de produção de clorofila-*a* (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n=2). 28
- Figura 3.** Concentração de carbono total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2). 32
- Figura 4.** Balanço de massa de carbono nos meios de cultura no início e no final da operação. A abreviatura do tratamento seguida por (i) é a concentração inicial e (f) é a concentração final. 33
- Figura 5.** Balanço de massa de nitrogênio nos meios de cultura no início e no final da operação. A abreviatura do tratamento seguida por (i) é a concentração inicial e (f) é a concentração final. 35
- Figura 6.** Concentração de nitrogênio amoniacal no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2). 36
- Figura 7.** Concentração de nitrogênio total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2). 38
- Figura 8.** Concentração de fósforo total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2). 39
- Figura 9.** Abundância relativa do biovolume da comunidade fitoplanctônica..... 54
- Figura 10.** Comportamento da concentração de clorofila-*a* no meio de cultivo ao longo da operação (n=2, barras verticais representam o desvio padrão)..... 56
- Figura 11.** Comportamento da concentração de carotenoides totais durante a operação (n=2, barras verticais representam o desvio padrão)..... 62
- Figura 12.** Exemplares de *Chlorella vulgaris* (1) e *Limnithrix planctonica* (2). 71
- Figura 13.** Monitoramento da radiação global (kJ/m²). 71

Figura 14. Monitoramento da temperatura do ar (°C).....	72
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização das águas residuais e meios de cultura de tratamento (valores médios e desvio padrão, n=2).....	21
Tabela 2. Produção e produtividade de clorofila- <i>a</i> e sólidos suspensos voláteis (biomassa) (valores médios \pm desvio padrão amostral). Letras sobrescritas distintas indicam uma diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância	30
Tabela 3. Caracterização das águas residuárias (valores médios, desvio padrão entre parênteses).....	49
Tabela 4. Siglas, condição do meio de cultivo em relação à recomendação da USDA e composição do meio de cultivo.	50
Tabela 5. Caracterização dos meios de cultivo dos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses).	50
Tabela 6. Produção de de sólidos suspensos totais recuperada nos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).....	55
Tabela 7. Eficiência da colheita nos tratamentos (%) (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).....	56
Tabela 8. Conteúdo de lipídeos em peso seco nos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).....	58
Tabela 9. Produtividade lipídica dos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).....	58
Tabela 10. Perfil de ácidos graxos da biomassa obtida no tratamento de águas residuárias em % (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2). \pm	59
Tabela 11. Concentração de carotenoides nas biomassas, nos meios de cultivo e produtividades (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).	63
Tabela 12. Dados da comunidade fitoplanctônica, densidade de indivíduos e biovolume.....	72
(Continuação) Tabela 12. Dados da comunidade fitoplanctônica, densidade de indivíduos e biovolume.....	73

Tabela 13. Fração de amônia livre no meio de cultivo durante o monitoramento. 74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ARIA	Água residuária da indústria alimentícia
ARIC	Água residuária da indústria cervejeira
C	Carbono
CID	Carbono inorgânico dissolvido
COD	Carbono orgânico dissolvido
CTD	Carbono total dissolvido
DEF	Tratamento com déficit de carbono
DEF+	Tratamento com déficit de carbono superior
EXC	Tratamento com excesso de carbono
EXC+	Tratamento com excesso de carbono superior
LATs	Lagoas de alta taxa
LESA	Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental
N	Nitrogênio
OD	Oxigênio dissolvido
OPT	Tratamento com razão de carbono recomenda
P	Fósforo
pH	Potencial hidrogeniônico
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa
SST	Sólidos suspensos totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
UFV	Universidade Federal de Viçosa
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1. HIPÓTESES	15
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
ARTIGO 1 – Integração de águas residuárias da indústria alimentícia e cervejeira no cultivo de microalgas: avaliação da influência de diferentes condições nutricionais na eficiência de remoção de nutrientes e produção de biomassa.....	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1. Meio de cultivo.....	20
2.2. Operação	21
2.2. Monitoramento	22
2.3. Estatísticas.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1. Variáveis ambientais.....	25
3.2. Produção de biomassa.....	27
3.2.1. Comunidade fitoplanctônica	27
3.2.2. Crescimento de microalgas (clorofila- <i>a</i>).....	28
3.2.3. Rendimentos de biomassa primária e total.....	30
3.3. Desempenho do tratamento de águas residuais.....	31
3.3.1. Remoção de Carbono.....	31
3.3.2. Remoção de Nitrogênio	34
3.3.3. Fósforo	38
4. CONCLUSÃO	41
5. REFERÊNCIAS.....	42
ARTIGO 2 – Efeitos da disponibilidade de nutrientes na produção de bioprodutos de valor agregado no tratamento de águas residuárias industriais	45
RESUMO	45
1. INTRODUÇÃO.....	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
2.1 Área de estudo	48
2.2 Unidade experimental	48
2.3 Meio de cultivo.....	48
2.4 Delineamento experimental	49

2.5 Condições de cultivo.....	50
2.5 Operação	50
2.6 Monitoramento	51
2.7 Análise da biomassa	52
2.8 Estatística	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
3.1 Comunidade fitoplanctônica	54
3.2 Produção de biomassa e eficiência da colheita	55
3.3 Lipídeos.....	57
3.3.1 Acúmulo e produtividade lipídica	57
3.3.2 Produtividade lipídica	58
3.4 Perfil de ácidos graxos.....	59
3.5 Carotenoides.....	61
3.6 Biomassa e potencial na suplementação animal	63
4. CONCLUSÃO	65
5. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE – Material suplementar.....	71

1. HIPÓTESES

- a) A eficiência do tratamento de águas residuárias será influenciada pelas diferentes condições nutricionais promovidas durante o cultivo.
- b) O crescimento do consórcio microalga-bactéria será afetado pela disponibilidade nutricional distinta dos meios de cultivo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar diferentes condições nutricionais obtidas a partir da integração do tratamento de águas residuárias das indústrias de processamento de carnes e cervejeira no cultivo de microalgas.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência da disponibilidade de nutrientes na produção de biomassa.

- b) Avaliar a influência da disponibilidade de nutrientes na eficiência do tratamento de águas residuárias.

ARTIGO 1 – Integração de águas residuárias da indústria alimentícia e cervejeira no cultivo de microalgas: avaliação da influência de diferentes condições nutricionais na eficiência de remoção de nutrientes e produção de biomassa

Resumo

O tratamento de águas residuárias baseado em tecnologias de microalgas tem sido amplamente estudado e aplicado por alcançar elevada eficiência na remoção de carbono, nitrogênio e fósforo. Tal eficiência pode ser afetada por diversos fatores, como a composição do meio de cultivo. O presente trabalho buscou avaliar a influência das razões C/N/P no tratamento de águas residuárias e no crescimento da biomassa. Meios de cultivo nas condições ótima, déficit e superávit de carbono foram avaliados. Tais condições foram obtidas variando-se as razões C/N e C/P ao misturar águas residuárias de indústria alimentícia, que possuía deficiência de carbono, e de indústria cervejeira, com elevado teor de carbono. A remoção de carbono, nitrogênio e fósforo totais foi influenciada pela disponibilidade de nutrientes. Quanto ao crescimento da biomassa, não houve diferença significativa entre as condições avaliadas, evidenciando a capacidade do consórcio de bactérias e microalgas de se adaptar às condições diversas.

Palavras-chave: disponibilidade de nutrientes; microalgas; biomassa; tratamento de águas residuárias; remoção de nutrientes.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população humana e das atividades industriais vem aumentando a demanda por água e conseqüentemente aumentando a produção de águas residuárias (NATH; MISHRA; PANDE, 2021). A ausência ou baixa eficiência do tratamento de águas residuárias pode causar impactos ambientais nos recursos hídricos devido à presença de diversos contaminantes, como carbono, nitrogênio e fósforo.

A biotecnologia de microalgas tem atraído atenção considerável pela capacidade em recuperar nutrientes e promover o tratamento (AHMAD et al., 2022; GOSWAMI et al., 2020), gerando biomassa com valor agregado e melhorando a sustentabilidade ambiental e econômica do tratamento de águas residuárias em um ciclo fechado. No entanto, a tecnologia ainda necessita de avanços de forma a difundir sua aplicabilidade e potencial de biorremediação para os mais variados tipos de águas residuárias (AHMAD et al., 2022). Assim, diferentes condições nutricionais podem ser utilizadas para otimização do crescimento e desenvolvimento algal, influenciando conseqüentemente na eficiência do processo de remoção de poluentes e recuperação de nutrientes. As razões carbono/nitrogênio (C/N) e carbono/fósforo (C/P), podem ser utilizadas como parâmetro de identificação de déficit ou superávit de nutrientes quando o meio para o cultivo de microalgas são águas residuárias (CHIU et al., 2015). A recomendação para o crescimento ótimo de biomassa de microalgas é uma relação mássica C/N igual a 6 e C/P igual a 48 (USDA, 1992).

Nesse contexto, a disponibilidade de nutrientes do meio de cultivo é importante para favorecer o equilíbrio da simbiose entre os diferentes microrganismos presentes e, assim, promover a biorremediação das águas residuárias (SARAVANAN et al., 2021). A deficiência de carbono, nitrogênio ou fósforo pode causar limitação do crescimento da biomassa algal e conseqüentemente redução da eficiência de remoção de nutrientes (SUTHERLAND et al., 2015). Por diversas vezes o nutriente limitante para o desenvolvimento das microalgas em águas residuárias é o carbono. Seu déficit nos meios de cultivo pode ser superado pela adição de CO₂ ou pela suplementação de carbono orgânico, como por exemplo, adição de glicerol bruto da indústria de biodiesel, açúcares de resíduos industriais e agrícolas, e melão de cana (CHIU et al., 2015).

Além dessas, uma alternativa é a mistura de diferentes águas residuárias, visando a obtenção de um meio de cultivo mais balanceado. (ZHENG et al., 2018) cultivaram *Chlorella Vulgaris* utilizando águas residuárias mistas após autoclavagem como meio de cultivo. Para balancear as razões C/N, águas residuárias de suinocultura (rica em N) foram misturadas com águas residuárias de cervejaria (rica em C). A condição ótima para remoção de nutrientes e produção de biomassa foi C/N igual a 7,9. A disponibilidade de nitrogênio foi identificada pelos autores como inibidora ou promotora do crescimento de microalgas, quando C/N estava acima ou abaixo da faixa ótima, respectivamente. Outros trabalhos também avaliaram a influência de diferentes condições nutricionais do meio de cultivo. Xu et al. (2017) e Yan et al. (2013) utilizaram águas residuárias sintéticas e fixaram a razão C/N em três valores, 2,5, 5 e 10. Em ambos os estudos, para a maioria das variáveis monitoradas, o melhor desempenho foi obtido para a condição C/N igual a 5.

Assim, o presente estudo buscou avaliar o tratamento integrado de águas residuárias (2 tipos de águas residuárias em um mesmo reator) utilizando uma tecnologia simples e de baixo custo. Além disso, avançar os conhecimentos acerca do tratamento de águas residuárias mistas em condições mais próximas das encontradas em escala real. Considerando que a eficiência do tratamento e produção de biomassa serão influenciadas pelas diferentes condições nutricionais promovidas durante o cultivo, foi avaliado a influência das diferentes razões C/N/P na eficiência de remoção de nutrientes e na produção de biomassa. Para isso, diferentes dosagens de águas residuárias de indústria de alimentos (ARIA) e de indústria cervejeira (ARIC), além de fontes de nitrogênio e fósforo, foram misturadas de forma a obter meios de cultura com superávit e déficit de carbono, e identificar a melhor condição nutricional para a performance do tratamento e produção de biomassa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Meio de cultivo

Dois tipos de águas residuárias foram utilizados como meio de cultivo, um da indústria alimentícia (processamento de carne) (ARIA) e outro da indústria cervejeira (ARIC). A indústria alimentícia possui um sistema de tratamento de águas residuárias composto por grades, flotação, tanque de aeração, decantadores e unidades de leito de secagem. A ARIA foi coletada na saída da unidade de flotação. A ARIC foi produzida na etapa de fervura do mosto, submetida a um processo de sedimentação gravitacional por 12 h, sendo então utilizada no experimento.

A caracterização de ambas as águas residuárias revelou que, de acordo com a recomendação do USDA (1992) ($C/N = 6$ e $C/P = 48$), a ARIA é deficiente em carbono com razão C/N de 5,4 e razão C/P de 35. Já a ARIC apresentou relação C/N de 707 e relação C/P de 107, impedindo o crescimento de microalgas por limitar N e P e possuir alta carga de carbono.

ARIC foi misturada com ARIA para variar as razões mássicas, fazendo com que as razões C/N e C/P aumentassem devido ao excesso de carbono na ARIC. Assim, para obter um meio de cultura em que as relações C/N e C/P fossem inferiores às da ARIA, ureia (99%, Vetec, Sigma-Aldrich, Brasil ®) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (98%, Vetec, Sigma-Aldrich, Brasil®) foram adicionados. A definição de cada composição foi baseada no balanço de massa, considerando as concentrações totais de carbono, nitrogênio e fósforo na ARIA e na ARIC. Assim, as relações C/N e C/P de cada meio de cultura foram previamente estabelecidas com base na relação de mistura da água residuária e na quantidade de fósforo e nitrogênio a ser adicionado.

As composições dos meios de cultura resultantes do balanço de massa foram as seguintes: meios de cultura com maior déficit de carbono (DEF+, $C/N = 4,1$) obtidos a partir da adição de ureia e fosfato de sódio dibásico heptahidratado em ARIA. O meio de cultura com déficit de carbono (DEF, $C/N = 5,4$) foi composto por ARIA. A condição ótima (OPT, $C/N = 6,1$) foi obtida adicionando o ARIC ao ARIA, representando 0,5% e 99,5%, respectivamente. As condições em que o carbono estava em excesso moderado (EXC, $C/N = 7,4$) e em excesso superior (EXC+, $C/N = 8,2$) tiveram sua composição baseada em 99% e 98,5% de ARIA e 1%

e 1,5% de ARIC, respectivamente. Cada tratamento foi testado em duplicata nas LATs, totalizando 5 condições de mistura, e caracterizado antes e após a mistura e adição de nutrientes (Tabela 1).

Tabela 1 . Caracterização das águas residuais e meios de cultura de tratamento (valores médios e desvio padrão, n=2).

Meio de cultivo	pH	C total (mg/L)	N total (mg/L)	P total (mg/L)	C/N	C/P
ARIA	4,3 ± 0,1	371,2 ± 5,9	69,2 ± 0,9	10,0 ± 0,3	5,4 ± 0,02	35 ± 0,5
ARIC	3,3 ± 0,1	11.025 ± 100	15,6 ± 0,4	102,4 ± 3,9	707 ± 9,4	107 ± 3,1
DEF+	4,3 ± 0,1	375,7 ± 7,8	92,6 ± 1,5	14,4 ± 0,2	4,1 ± 0,15	26 ± 0,82
DEF	4,3 ± 0,1	366,7 ± 2,1	67,9 ± 0,6	10,4 ± 0,3	5,4 ± 0,02	35 ± 1,3
OPT	4,3 ± 0,1	453,8 ± 3,8	74,7 ± 0,7	9,8 ± 0,2	6,1 ± 0,01	46,5 ± 0,5
EXC	4,1 ± 0,1	534,6 ± 8,5	71,5 ± 0,6	9,9 ± 0,03	7,4 ± 0,05	53,5 ± 0,7
EXC+	4,1 ± 0,1	627,6 ± 10,7	76,8 ± 0,6	10,3 ± 0,5	8,2 ± 0,7	61 ± 3,7

2.2. Operação

As unidades experimentais foram operadas em batelada até o decaimento do crescimento algal, monitorado por análise de clorofila-*a* (Seção 5.2.2), totalizando 16 dias, entre 8 e 23 de agosto de 2021. Cada tratamento foi testado em duas unidades experimentais. O nível de água de todos os reatores foi medido diariamente a partir do primeiro dia de operação com uma régua posicionada nas laterais e no ponto médio transversal do canal dos reatores para reduzir os efeitos da evaporação dos meios de cultura (significativos devido à incrustação). Em seguida, água deionizada (GEHAKA®, modelo OS20LXE) foi adicionada aos reatores para manter o nível.

A biomassa foi previamente produzida em meio de cultura com as relações C/N e C/P determinadas pelo delineamento experimental deste trabalho (Tabela 1). Ao final da operação, os meios de cultura passaram por um processo de sedimentação por 12h, e o sobrenadante foi descartado. A biomassa sedimentada foi utilizada como inóculo na fase experimental, com 10% do volume do reator adicionado, mesma proporção utilizada por (ASSEMANY et al., 2016).

2.2. Monitoramento

Diariamente, com o auxílio de uma sonda Hach, modelo HQ40d, o oxigênio dissolvido (OD), o pH e a temperatura foram monitorados *in loco*. Além disso, a radiação fotossinteticamente ativa (PAR), dentro e fora da casa de vegetação, foi monitorada com o radiômetro LI-COR® LI-1500. O monitoramento foi realizado ao meio-dia, período de maior intensidade luminosa e temperatura ambiente. O monitoramento contínuo da radiação global foi obtido do banco de dados público da Estação Meteorológica da UFV (INMET, 2021). Para as demais variáveis avaliadas em laboratório, as alíquotas foram retiradas às 9h.

As análises laboratoriais foram realizadas conforme descrito nos *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater* (APHA-AWWA-WEF, 2012). A cada quatro dias, as seguintes variáveis foram analisadas para monitorar a disponibilidade de nutrientes: nitrogênio amoniacal (método 4500-NH₃C); nitrato (método 4599-NO₃E); e fósforo solúvel (método 4500 PC-amostra filtrada a 0,45 µm). Além disso, o carbono orgânico dissolvido (COD) e o carbono inorgânico dissolvido (CID) foram determinados na mesma frequência com o equipamento Shimadzu TOC C CSH e pela soma de ambos foi determinado o carbono total dissolvido (CTD). Semanalmente, o carbono total (CT) foi determinado com o equipamento Shimadzu TOC SSM 5000. Além disso, nestes períodos, nitrogênio Kjeldahl total (método 4500-N_{org}) e fósforo total (método 4500-PC) foram determinados com seus respectivos procedimentos descritos em APHA -AWA-WEF (2012).

Além disso, a cada quatro dias, o crescimento da biomassa foi monitorado com a determinação de sólidos suspensos totais e voláteis (SST e SSV, respectivamente) (método 2540E) (APHA - AWA-WEF, 2012), e clorofila-*a* pela técnica de extração em 80% de etanol conforme descrito no padrão holandês Nederland Norm (NEN) (1981) baseado em (NUSH, 1980). A taxa de crescimento específico no pico da produção de clorofila-*a* foi calculada de acordo com a Equação 1 (ASSIS et al., 2019):

$$\mu_{max} = \frac{(\ln X_i - \ln X_o)}{T_i - T_o}$$

Equação 1

Onde:

μ_{max} : taxa de crescimento específico no pico da produção de clorofila-*a* (d^{-1})

X_i : Concentração final de clorofila-*a* (mg/L)

X_o : Concentração inicial de clorofila-*a* (mg/L)

T_i : tempo final (d)

T_o : tempo inicial (d)

Para melhor compreensão dos principais mecanismos que atuam na remoção do nitrogênio, calculou-se a fração de amônia livre (%) no meio de cultura em função do pH e temperatura do meio de cultura de acordo com a Equação 3 (EMERSON et al., 1975).

$$\frac{\text{Free ammoniacal nitrogen}}{\text{Total ammonia nitrogen}} = \frac{100}{(1 + 10^{((0.09018 + (2729.92/(T + 273.2))) - pH))}}$$

Equação 2

Onde:

T: temperatura ($^{\circ}C$)

pH: potencial hidrogeniônico

Assim, para o balanço de massa de nitrogênio, considerou-se que a diferença entre a concentração inicial e as concentrações determinadas ao final da operação estava presente na forma de nitrito ou volatilizada na forma de nitrogênio amoniacal livre.

A comunidade fitoplanctônica foi caracterizada no inóculo e ao final da operação para verificar quais gêneros e espécies estavam presentes na biomassa, além de verificar se os gêneros e espécies inoculados eram prevalentes. Amostras de 50 mL foram coletadas das LATs e preservadas em solução de formol a 10%. A caracterização em nível de gênero foi realizada e as espécies foram identificadas para os gêneros dominantes. Os indivíduos foram contados em câmara de sedimentação sob microscópio invertido, conforme descrito por Uthermöl (1958). A identificação qualitativa foi realizada por meio de caracteres morfológicos de referências e bases de dados específicas “Algaebase”.

2.3. Estatísticas

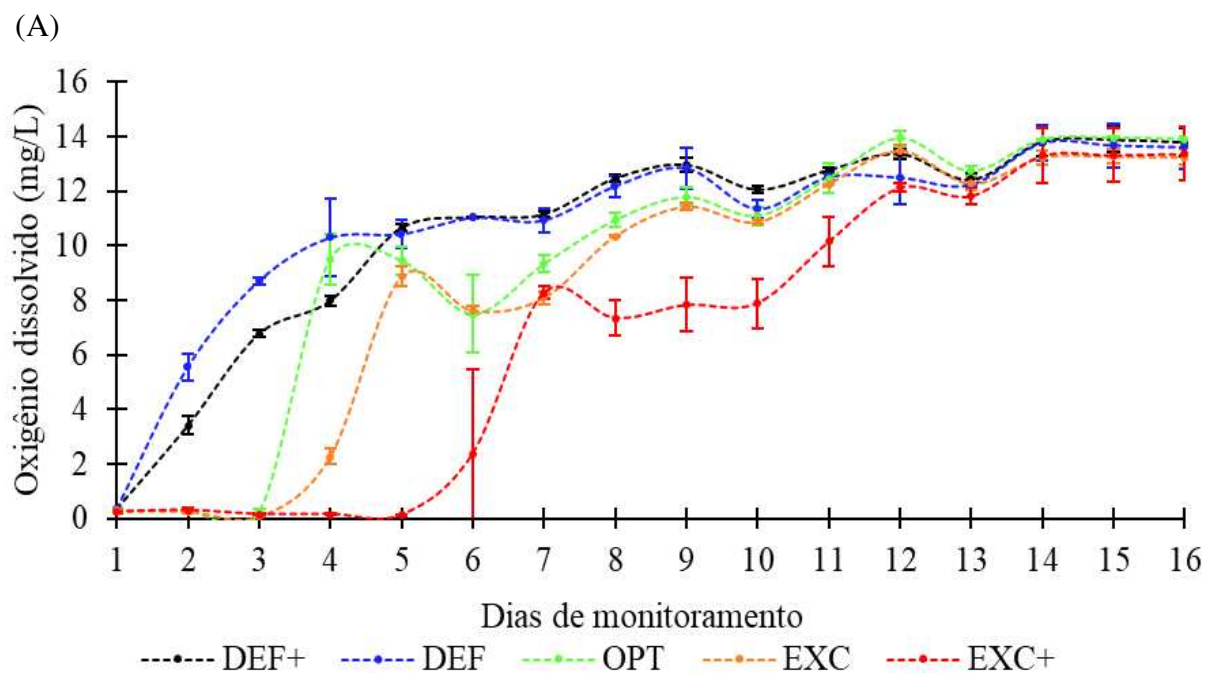
O software SAEG versão 9.1 foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Primeiramente, as variáveis foram aplicadas à análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 10%, assumindo um experimento em delineamento em blocos casualizados. Posteriormente, foi aplicado o teste de Duncan ao nível de significância de 10% para identificar pares de médias que diferem entre si.

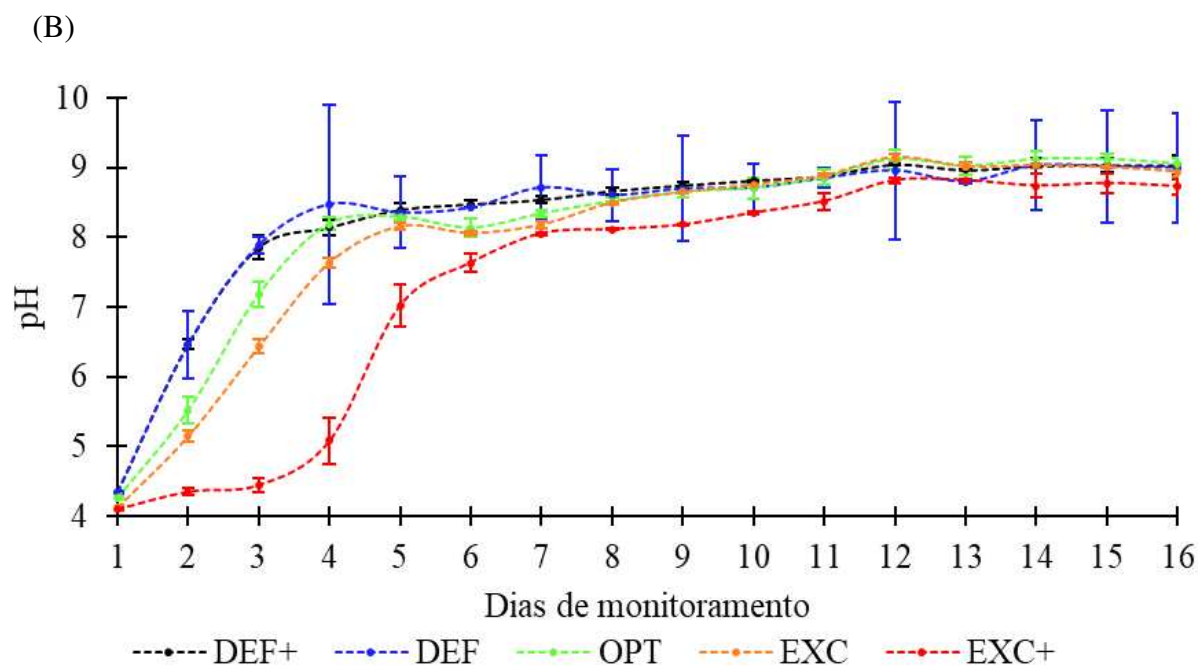
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Variáveis ambientais

A radiação global do meio-dia permaneceu entre 1774,6 e 3082,6 kJ/m² (INMET, 2021) (Figura 13, Apêndice A). A RFA fora da casa de vegetação atingiu valores mínimos e máximos de 285,3 e 1.981,4 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}^2$, respectivamente. Dentro da casa de vegetação, o PAR variou entre 95,3 e 650,8 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}^2$. Nos dias 6 e 10 de monitoramento, a RFA foi de 95,3 e 155,1 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}^2$, respectivamente, dentro da estufa. Conforme mostrado na Figura 1A, foi possível observar a interferência de baixos valores de RFA no monitoramento de OD nos dias citados acima, causando redução ou estabilização das concentrações de OD nos meios de cultura.

Figura 1. Variação do oxigênio dissolvido (A) e pH (B) ao meio-dia durante o período de monitoramento (n=2, as barras verticais representam o desvio padrão).





A temperatura dos meios de cultura ao meio-dia variou entre 19 e 22°C ao longo do experimento. Para um crescimento satisfatório das microalgas, é necessário manter a temperatura dos meios de cultura entre 18-30°C, visto que a temperatura está diretamente relacionada com as respostas celulares, fisiológicas e morfológicas das culturas de microalgas (VUPPALADADIYAM et al., 2018). No presente estudo, mesmo com as unidades experimentais localizadas em casa de vegetação, as baixas temperaturas do inverno mantiveram a temperatura do meio de cultura próxima aos valores mais baixos da referida faixa no horário mais quente do dia. O monitoramento contínuo da temperatura externa da casa de vegetação durante todo o período experimental é mostrado na Figura 11 (Apêndice A).

A Figura 1B mostra os valores obtidos no monitoramento do pH dos meios de cultura durante o experimento. Observou-se que valores elevados de pH (~ 9) foram alcançados em todos os tratamentos. No entanto, uma exceção foi observada para a condição EXC+, que apresentou valores ligeiramente inferiores a 9, indicando que as fontes de carbono presentes neste meio de cultura como resultado da adição de ARIC tornaram-se disponíveis para o crescimento da biomassa fotossintética, causando um efeito menos intenso no balanço de ácido carbônico e consequente menor elevação do pH.

A diferença entre os tratamentos com deficiência de carbono (DEF+ e DEF) em relação aos demais (OPT, EXC e EXC+) foi que o aumento do pH ocorreu em um intervalo de tempo menor, o que indica que a maior disponibilidade de carbono causou um atraso na elevação do

pH. Além disso, quanto maior o incremento de carbono, maior o tempo de atraso. Em meios de cultura em que há consórcio microalga-bacteriano, o aumento do pH pode indicar que a remoção de carbono inorgânico por fotossíntese ou precipitação é maior do que a produção de carbono inorgânico pela respiração microbiana, o que aumenta o valor do pH, alterando o equilíbrio de ácido carbônico (VAN DEN HENDE et al., 2016). O fato de o aumento do pH ter ocorrido em menor intervalo de tempo no meio deficiente em carbono indica que nesses tratamentos a fotossíntese se destacou, fazendo com que o consumo fosse superior à produção de carbono inorgânico.

O monitoramento das concentrações de OD (Figura 1A) reforçou a predominância da fotossíntese sobre a respiração em meios de cultura com déficit de carbono, em que o aumento das concentrações de OD nos meios DEF+ e DEF ocorreu mais cedo do que nos demais meios (OPT, EXC, EXC+). Além disso, quanto maior o aumento de carbono, mais tempo levou para aumentar as concentrações de oxigênio no meio de cultura, conforme observado para os valores de pH.

3.2. Produção de biomassa

3.2.1. Comunidade fitoplanctônica

Na comunidade fitoplanctônica do inóculo, as espécies *Chlorella vulgaris* (98,17 - 99,73 %), *Limnothrix planctonica* (0,46 - 1,79%), *Pseudanabaena catenata* (0 - 0,16%) e *Monoraphidium tortile* (0 - 0,05%), além de *Closterium sp.* (0 - 0,05%) e *Selenastrum sp.* (0 - 0,14%), foram identificados.

Ao final da fase experimental, o gênero *Selenastrum sp.* e a espécie *Monoraphidium tortile* foram observadas, juntamente com a espécie mais abundante, *Chlorella vulgaris*, com uma abundância relativa de 95,7-96,4% (Tabela 12, Apêndice). A espécie de cianobactéria *Limnothrix planctonica* também foi identificada em todos os tratamentos com abundância relativa entre 3,4-3,9%. Em menor abundância e não presente em todos os tratamentos, a espécie *Pseudanabaena catenata* foi identificada em OPT e EXC e o gênero *Closterium sp.* nos tratamentos DEF+ e EXC+.

A espécie de microalga com maior fração de biovolume da comunidade fitoplanctônica (Tabela 12, Apêndice) foi *Chlorella vulgaris* (59-63%), enquanto a espécie de cianobactéria *Limnothrix*

planctonica representou cerca de 40% do biovolume em todos os tratamentos. Esses resultados são consequência do fato de que a espécie *Limnothrix planctonica* apresenta dimensões superiores quando comparadas às células da espécie *Chlorella vulgaris*, desempenhando um papel importante na fração de biovolume da comunidade fitoplanctônica dos meios de cultura.

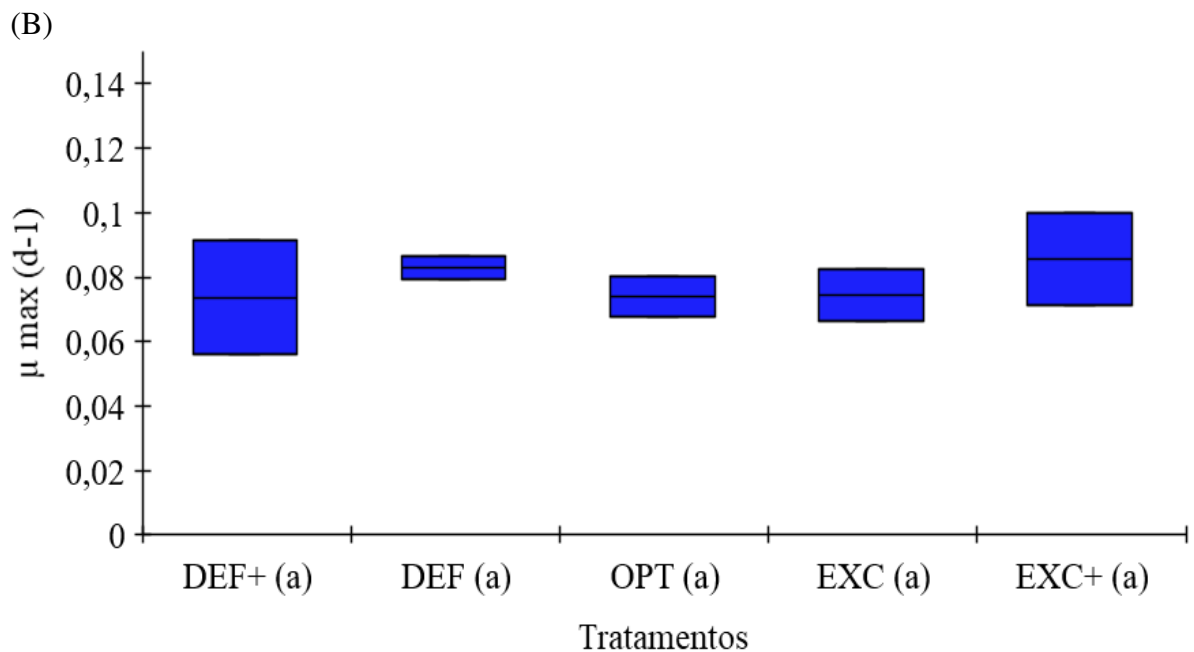
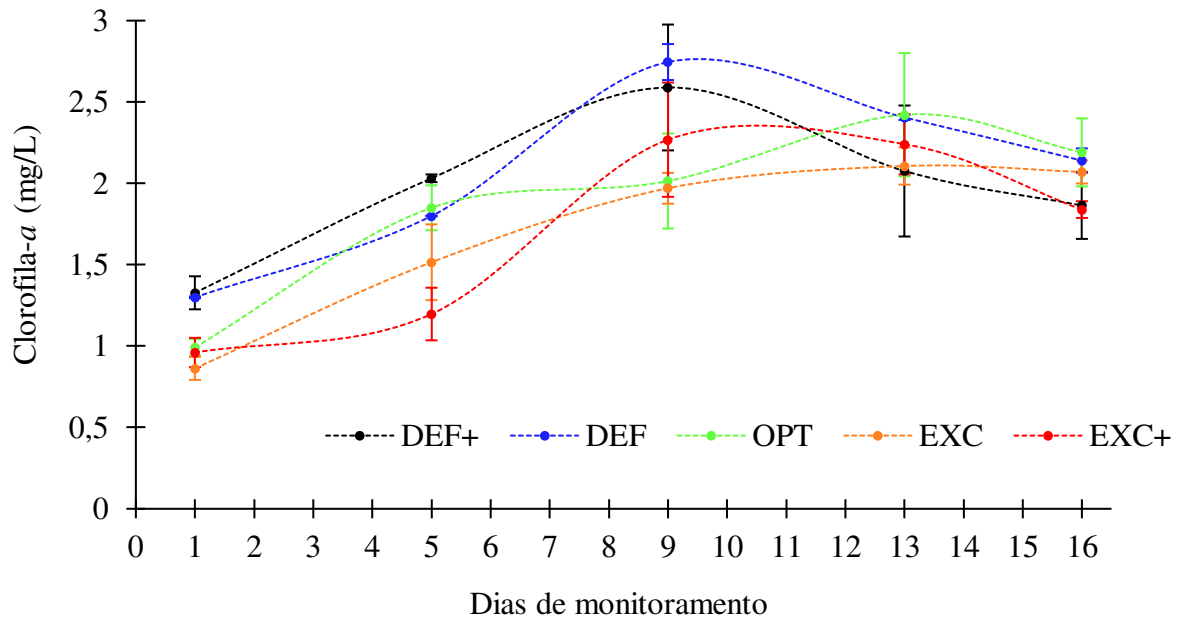
A espécie *Chlorella vulgaris* é reconhecida por ser resistente a condições adversas. Além disso, possui um metabolismo adaptável, sendo capaz de crescer autotroficamente e heterotroficamente e também combinando ambas as vias metabólicas (metabolismo mixotrófico). Além disso, é capaz de remover 45-97% do nitrogênio e 28-96% do fósforo em decorrência do seu crescimento (SAFI et al., 2014), tornando-se uma excelente opção para o tratamento de águas residuárias. Embora também encontrada na biomassa produzida no tratamento de águas residuárias, como no trabalho de (ALCÁNTARA et al., 2015), a espécie *Limnothrix planctonica* é normalmente alvo de estudos relacionados a floração de cianobactérias em águas superficiais (HUO et al., 2021; SOMDEE; KAEWSAN; SOMDEE, 2013), o que torna limitado o conhecimento de seu impacto no tratamento de efluentes.

3.2.2. Crescimento de microalgas (clorofila-*a*)

Na Figura 2 é possível observar a variação da concentração de clorofila-*a* ao longo do experimento (Figura 2A) e a variação das taxas de crescimento específico no pico de produção de clorofila-*a* (μ_{max}) (Figura 2B).

Figura 2. Concentração de clorofila-*a* no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e taxa de crescimento específica no pico de produção de clorofila-*a* (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n=2).

(A)



Foi possível observar que alguns tratamentos (DEF+, DEF e EXC+) atingiram os picos de produção de clorofila-*a* antes dos demais (no dia 9 de monitoramento), e após isso, apresentaram tendência de queda e estabilização. Os tratamentos OPT e EXC atingiram valores máximos no dia 13 e depois tenderam a se estabilizar. Apesar das diferenças apresentadas, os valores de μ_{max} dos tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,1$). Possivelmente, houve uma adaptação metabólica das espécies às condições de déficit de carbono, não causando prejuízo no crescimento quando comparado aos demais tratamentos.

A *Chlorella vulgaris*, por exemplo, é reconhecida por ter um metabolismo adaptável (ZUÑIGA et al., 2016), e dada sua participação na comunidade fitoplanctônica (Seção 3.2.1), tal comportamento pode ser justificado. Yan et al. (2015) observaram comportamento semelhante em experimentos com iluminação controlada em águas residuárias sintéticas onde a glicose foi a fonte de carbono. Os tratamentos apresentaram diferentes relações C/N, e as condições testadas não tiveram efeito significativo sobre a taxa de crescimento de *Chlorella vulgaris*. Zheng et al. (2018) relataram maior crescimento de microalgas na razão C/N de 7,9 ao comparar com razões mais extremas de déficit e excesso de carbono. No presente estudo, assim como μ_{max} , a produção e produtividade de clorofila-*a* (Tabela 2) não variaram significativamente entre os tratamentos ($p > 0,1$), o que reforça a indicação de que houve uma adaptação metabólica, permitindo o crescimento das microalgas mesmo quando a disponibilidade de carbono foi menor.

Tabela 2. Produção e produtividade de clorofila-*a* e sólidos suspensos voláteis (biomassa) (valores médios \pm desvio padrão amostral). Letras sobrescritas distintas indicam uma diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância

	Tratamentos	Pico de produção (g/m ²)	Produtividade máxima (g/m ² .d)	Produção final (g/m ²)	Produtividade final (g/m ² .d)
Clorofila- <i>a</i> (produção ou produtividade primária)	DEF+	0,39 ^a \pm 0,06	0,05 ^a \pm 0,01	0,28 ^a \pm 0,03	0,02 ^a \pm 0
	DEF	0,41 ^a \pm 0,02	0,05 ^a \pm 0	0,32 ^a \pm 0,01	0,02 ^a \pm 0
	OTP	0,36 ^a \pm 0,06	0,03 ^a \pm 0	0,33 ^a \pm 0,03	0,02 ^a \pm 0
	EXC	0,32 ^a \pm 0,02	0,03 ^a \pm 0	0,31 ^a \pm 0,01	0,02 ^a \pm 0
	EXC+	0,35 ^a \pm 0,04	0,04 ^a \pm 0,01	0,28 ^a \pm 0,01	0,02 ^a \pm 0
Biomassa (produção ou produtividade da biomassa total)	DEF+	61,5 ^a \pm 2,55	7,7 ^a \pm 0,32	71,6 ^a \pm 2,65	4,5 ^a \pm 0,17
	DEF	63,0 ^a \pm 12,73	7,9 ^a \pm 1,59	80,6 ^a \pm 20,68	5 ^a \pm 1,29
	OPT	57,8 ^a \pm 10,61	4,8b \pm 0,88 –	66,4 ^a \pm 15,91	4,1 ^a \pm 0,99
	EXC	54,2 ^a \pm 3,45	4,5b \pm 0,29 –	64,3 ^a \pm 1,86	4,0 ^a \pm 0,12
	EXC+	60,0 ^a \pm 4,3	6,4 ^{ab} \pm 2,23	79,9 ^a \pm 6,36	5 ^a \pm 0,4

3.2.3. Rendimentos de biomassa primária e total

Sólidos suspensos podem fornecer informações sobre remoção de matéria orgânica e crescimento de biomassa. Microrganismos heterotróficos contribuem para a redução da

concentração de sólidos por assimilação de matéria orgânica particulada, mas, por outro lado, a assimilação por microrganismos favorece o crescimento de biomassa, o que aumenta a concentração de SSV (SILVEIRA et al., 2021).

A relação clorofila-*a*/SSV pode ser considerada um indicador do estado da cultura, sendo encontrados valores inferiores a 1% em populações de microalgas não saudáveis, provavelmente afetadas pela competição com outros microrganismos (VELOSO et al., 1991). No presente estudo, a razão clorofila-*a*/SSV foi inferior a 1% no pico de produção de clorofila-*a* para todos os tratamentos, indicando biomassa composta majoritariamente por organismos não fotossintetizantes. Além disso, como observado para os valores de μ_{max} , as diferentes condições nutricionais não causaram efeito significativo ($p > 0,1$) nessa relação. A concentração inicial de SSV do meio de cultura, que foi em média $541,4 \pm 57$ mg/L, pode ter influenciado negativamente devido à alta disponibilidade de matéria orgânica para crescimento heterotrófico.

Ao contrário, para os valores de produtividade total de biomassa (SSV) no pico de produção de clorofila-*a*, houve efeito significativo de diferentes condições nutricionais ($p < 0,1$) (Tabela 2). Nos tratamentos com déficit de carbono (DEF+ e DEF) a produtividade foi maior, atingindo valores de $7,7$ g/m² e $7,9$ g/ m².d, respectivamente. A ocorrência tardia do pico de clorofila-*a* influenciou esse resultado nos tratamentos OPT e EXC, em que a produtividade foi de $4,8$ g/m² e $4,5$ g/ m².d, respectivamente. Ao final do monitoramento, não houve efeito das diferentes condições nutricionais sobre a produtividade do SSV ($p > 0,1$). Tais observações somadas aos resultados da clorofila-*a* do presente estudo demonstram a capacidade da biomassa mista de se adaptar às diferentes condições nutricionais testadas ao longo do período monitorado.

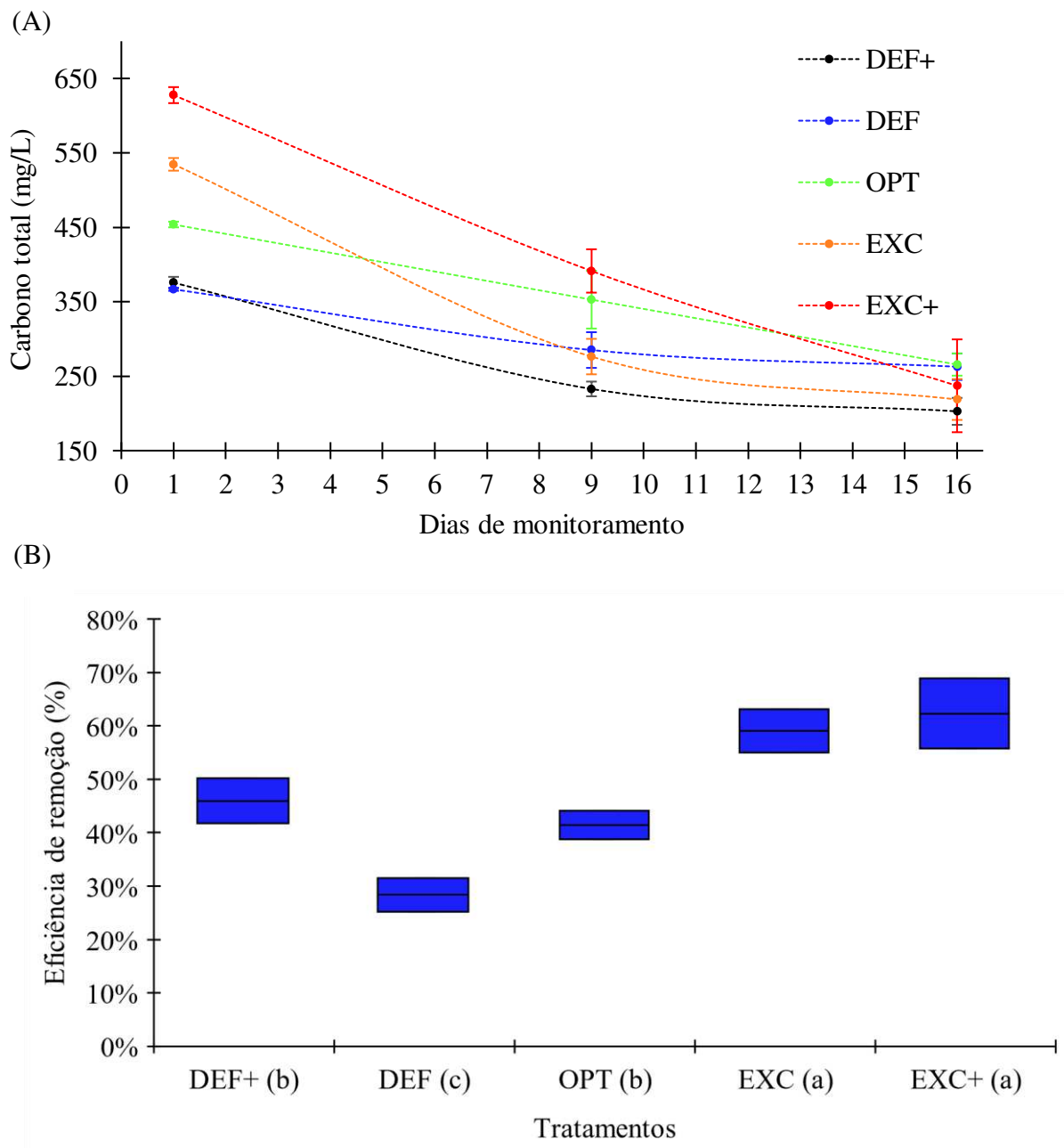
3.3. Desempenho do tratamento de águas residuais

3.3.1. Remoção de Carbono

As concentrações de carbono total diminuíram em todos os meios de cultura (Figura 3A), independentemente de os tratamentos partirem de diferentes concentrações iniciais. Em LATs, o carbono pode ser removido do meio de cultura devido ao metabolismo heterotrófico

do carbono orgânico ou precipitação química de carbonato e bicarbonato (KIM et al., 2013; VAN DEN HENDE et al., 2016).

Figura 3. Concentração de carbono total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n=2).

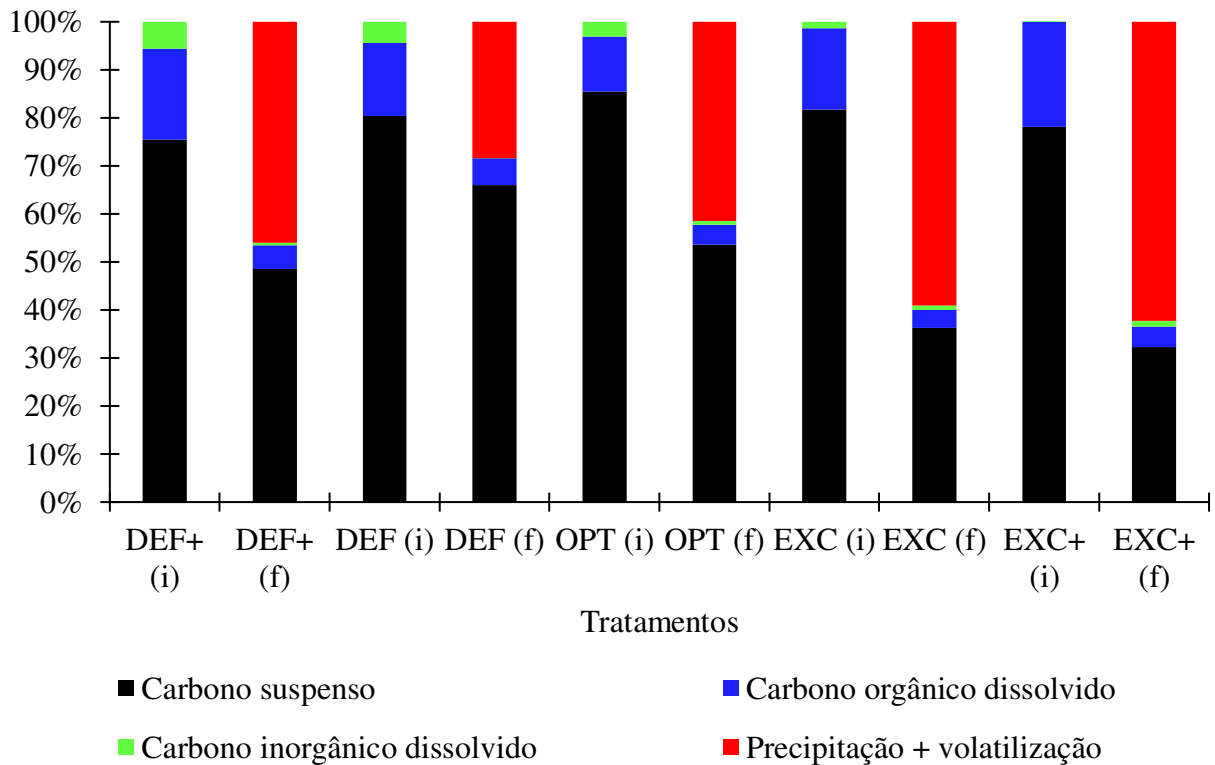


Em termos de eficiência total de remoção de carbono (Figura 3B), os tratamentos EXC (62%) e EXC+ (59%) tiveram um desempenho significativamente superior ($p < 0,1$) em

comparação com os tratamentos OPT (41%) e DEF+ (46%), enquanto o DEF condição (28%) teve o pior desempenho. Portanto, o aumento das relações C/N e C/P aumentou a eficiência de remoção de carbono quando as relações foram superiores a 7,4 e 53,5 nos tratamentos EXC e EXC+. Esse resultado pode ser explicado pela maior disponibilidade de carbono que promoveu maior crescimento de organismos heterotróficos (no caso do tratamento EXC+, ver Seção 3.2.3), refletido também em um maior equilíbrio entre respiração e fotossíntese, observado nos comportamentos de pH e OD (Seção 3.1).

A eficiência total de remoção de carbono dissolvido foi de 68 - 78% para todas as condições, sem diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,1$). Em todos os tratamentos, houve redução da fração orgânica do carbono dissolvido, fonte de carbono disponível associada ao crescimento de microrganismos com metabolismo heterotrófico/mixotrófico. O único tratamento em que a fração inorgânica foi maior ao final da operação foi no tratamento EXC+, o que pode estar associado à maior disponibilidade de carbono e, novamente, reflexo do maior equilíbrio entre respiração e fotossíntese (Seção 3.1). Avaliando o balanço de massa de carbono (Figura 4), é possível verificar que uma fração considerável foi retirada do meio de cultura e, portanto, não incorporada ao crescimento da biomassa, que nesse sentido foi mais eficiente quando a relação C/N foi de 5,4 (DEF).

Figura 4. Balanço de massa de carbono nos meios de cultura no início e no final da operação. A abreviatura do tratamento seguida por (i) é a concentração inicial e (f) é a concentração final.



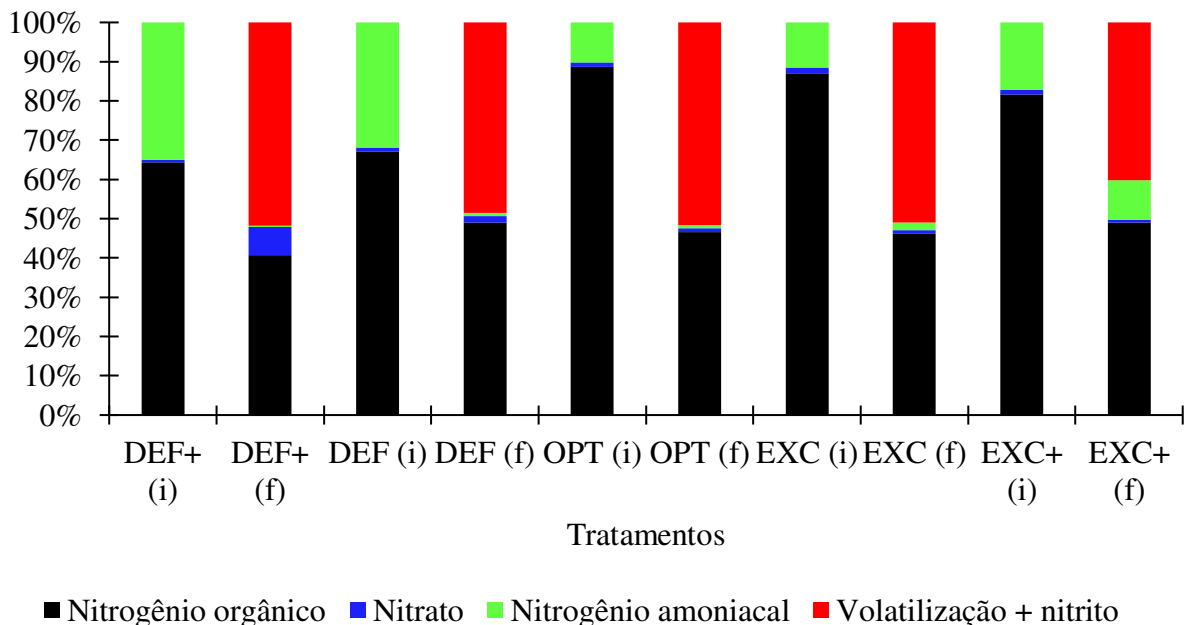
Os tratamentos em que o carbono foi mais abundante (EXC e EXC+) tiveram melhor desempenho na remoção de carbono como também observado por Gao et al. (2019). No entanto, houve diferença devido ao tratamento DEF+ ter apresentado melhor desempenho do que os tratamentos em que a limitação de carbono foi menor (DEF e OPT). Esse resultado pode ter sido influenciado pela forma como as razões mássicas foram variadas, que neste tratamento (DEF+) foi realizada pela adição de nitrogênio e fósforo nos meios de cultura, enquanto nos demais pela adição de carbono presente na ARIC.

A adição de nitrogênio e fósforo, que resultou em razões C/N e C/P de 4,1 e 26, respectivamente (DEF+), aumentou a eficiência de remoção de carbono pelo consórcio microalga-bactéria, uma vez que o déficit de carbono foi maior neste tratamento, e a remoção de carbono no DEF+ foi maior ($p < 0,1$) do que no tratamento DEF. Este resultado indica que a eficiência de remoção de carbono depende das relações C/N/P e da quantidade de N e P disponível. Portanto, supõe-se que a maior disponibilidade de nitrogênio e fósforo proporcionou melhores condições para microrganismos heterotróficos.

3.3.2. Remoção de Nitrogênio

A partir do balanço de massa de nitrogênio no início e no final da operação (Figura 5), é possível observar uma redução nas frações de nitrogênio orgânico e nitrogênio amoniacal em todos os tratamentos. Portanto, concluiu-se que a degradação da fração nitrogenada foi superior à formação do nitrogênio orgânico. Para o presente estudo, a assimilação de nitrogênio amoniacal ou nitrato com o crescimento da biomassa microalgal não foi significativa. Assim, as frações de nitrogênio orgânico e total foram reduzidas ao final da operação para todos os tratamentos (Figura 5 e 8A).

Figura 5. Balanço de massa de nitrogênio nos meios de cultura no início e no final da operação. A abreviatura do tratamento seguida por (i) é a concentração inicial e (f) é a concentração final.

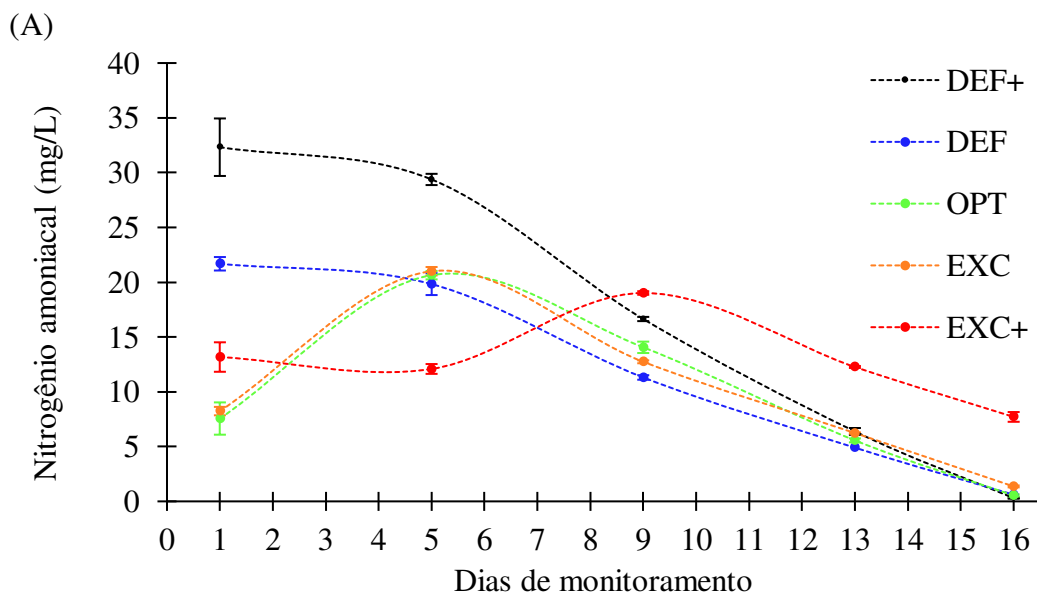


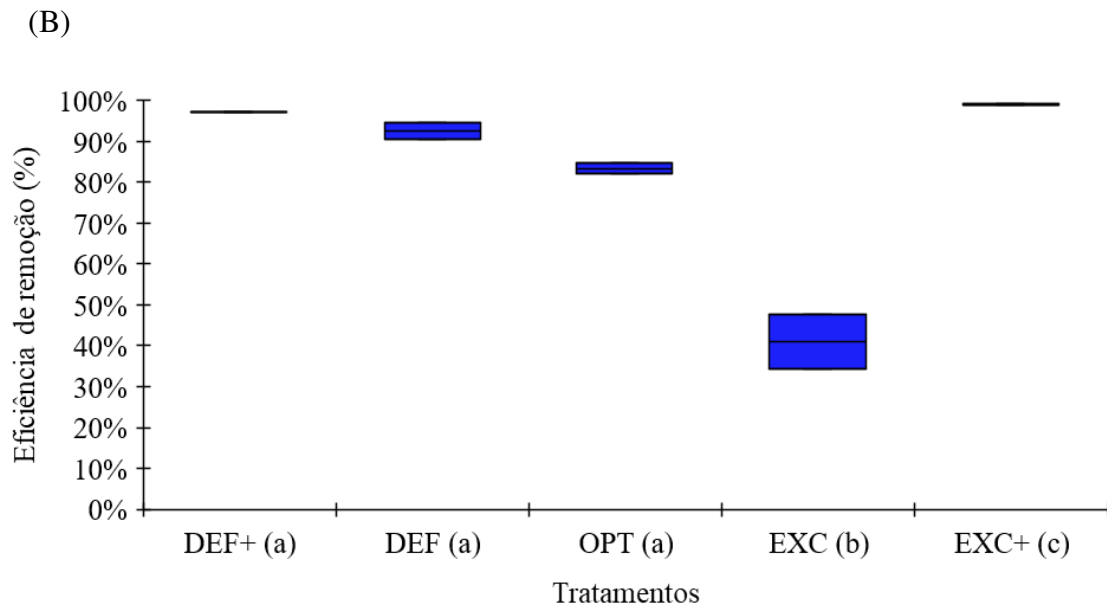
A volatilização do nitrogênio amoniacal pode ser a principal via de remoção do nitrogênio em LATs onde o meio de cultura é limitado em carbono inorgânico. Essa rota de remoção depende da fração de amônia livre, que por sua vez depende do pH (>9 na maioria das condições) e da temperatura do meio, que variou ao longo do período experimental em todas as condições de 20 a 25°C. Assim, a volatilização pode ser favorecida pelo aumento da atividade fotossintética das microalgas, que eleva o pH dos meios de cultura ao consumir carbono inorgânico (COUTO et al., 2015). A fração de amônia livre foi inferior a 6,1% até o dia 9 de monitoramento para o tratamento EXC+, enquanto nos demais tratamentos (no mesmo período), a fração livre ficou entre 16 e 19,7% (Tabela 13, Apêndice). Além disso, foi possível observar a redução mais acentuada nas concentrações de nitrogênio amoniacal total quando o

pH estava próximo de 9 devido à volatilização da amônia. Tais observações indicam que a volatilização da fração amônia livre foi o principal mecanismo de remoção do nitrogênio amoniacal em todos os tratamentos, inclusive na condição EXC+, com maior disponibilidade de C.

A adição da ARIC influenciou a variável nitrogênio amoniacal (Figura 6A), diminuindo sua concentração inicial entre os tratamentos DEF+, DEF e OPT. No entanto, a concentração final permaneceu próxima para a maioria dos tratamentos, exceto para a condição EXC+ (7,7 mg/L). A eficiência de remoção foi significativamente superior ($p < 0,1$) nos tratamentos DEF+, DEF, OPT (99%, 97%, 95%, respectivamente) (Figura 6B). O pior desempenho foi observado no tratamento EXC+ (41%), o que indica que o incremento de carbono influenciou negativamente na eficiência de remoção desta variável, pois esta condição apresentou os menores valores de pH (seção 3.1) durante o período experimental.

Figura 6. Concentração de nitrogênio amoniacal no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam uma diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, $n = 2$).

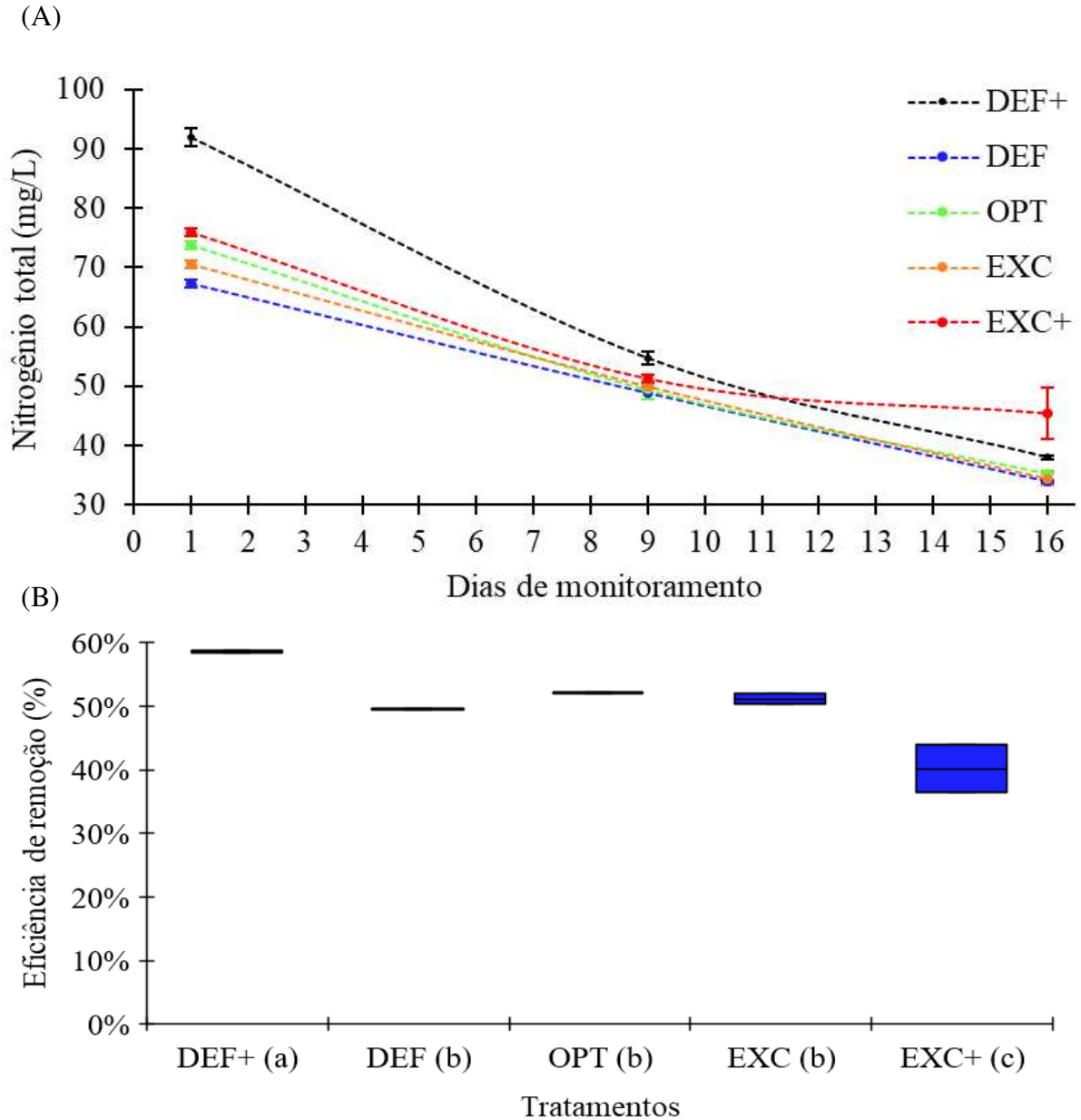




A eficiência de remoção de nitrato foi significativamente superior ($p < 0,1$) nos tratamentos EXC e EXC+ (35% e 38,8%, respectivamente). O tratamento OPT obteve remoção de nitrato de 5,6%, enquanto DEF e DEF+ aumentaram suas concentrações em 71,4 e 178,6%, respectivamente. Assim, pode-se concluir que o aumento de carbono foi positivo na eficiência de remoção desta variável, impedindo a formação de nitrato. Supõe-se que não houve condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento de bactérias nitrificantes, devido ao excesso de carbono que favoreceu a competição com os microrganismos heterotróficos, de crescimento mais rápido (Seção 3.3.1), além das menores concentrações de OD ao longo da cultura para esses tratamentos (EXC e EXC+) (Figura 1A), conforme já justificado por (SEPEHRI; SARRAFZADEH; AVATEFFAZELI, 2020).

O tratamento DEF+ (59%) removeu significativamente mais nitrogênio total do que os tratamentos DEF (50%), OPT (52%) e EXC (51%) (Figura 7B), enquanto estes tiveram um desempenho significativamente melhor do que o tratamento EXC+ ($p < 0,1$). Esse resultado está parcialmente de acordo com os estudos de Yan et al. (2013), em que não foi observada diferença estatística na eficiência de remoção de nitrogênio total quando a variação da disponibilidade nutricional foi obtida pela adição de carbono nos meios de cultura. No entanto, foi significativamente maior quando o déficit de carbono foi obtido pelo aumento da concentração de nitrogênio. Os autores explicaram que baixas eficiências de remoção ocorrem quando as relações C/N são inadequadas. Assim, conclui-se que, para a variável nitrogênio do presente estudo, a relação C/N de 8,2 (EXC+) foi inadequada para remover essa variável.

Figura 7. Concentração de nitrogênio total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2).

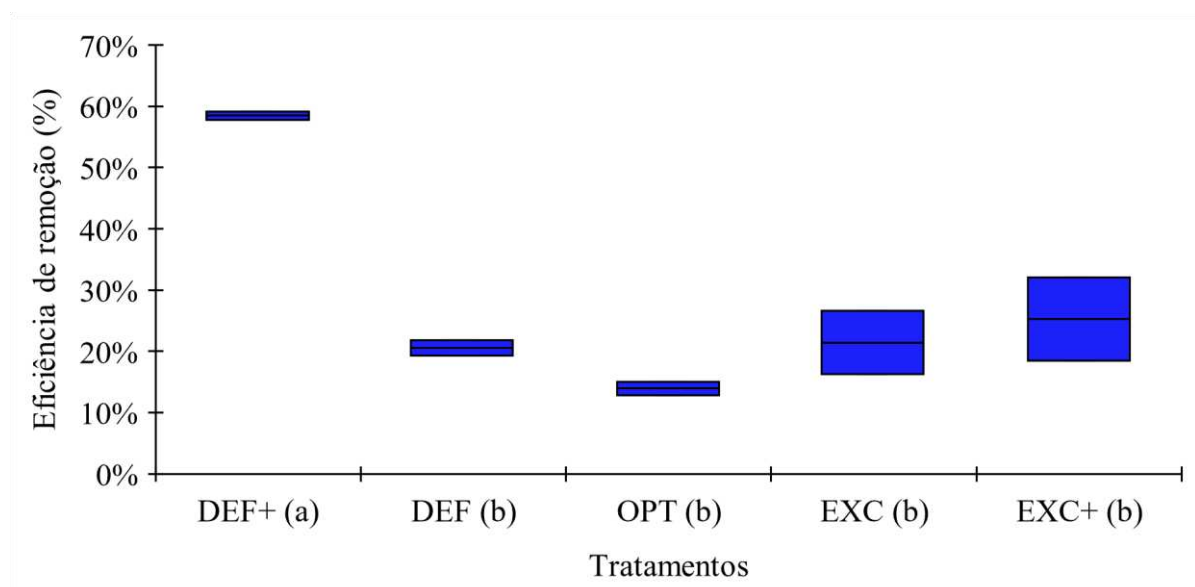
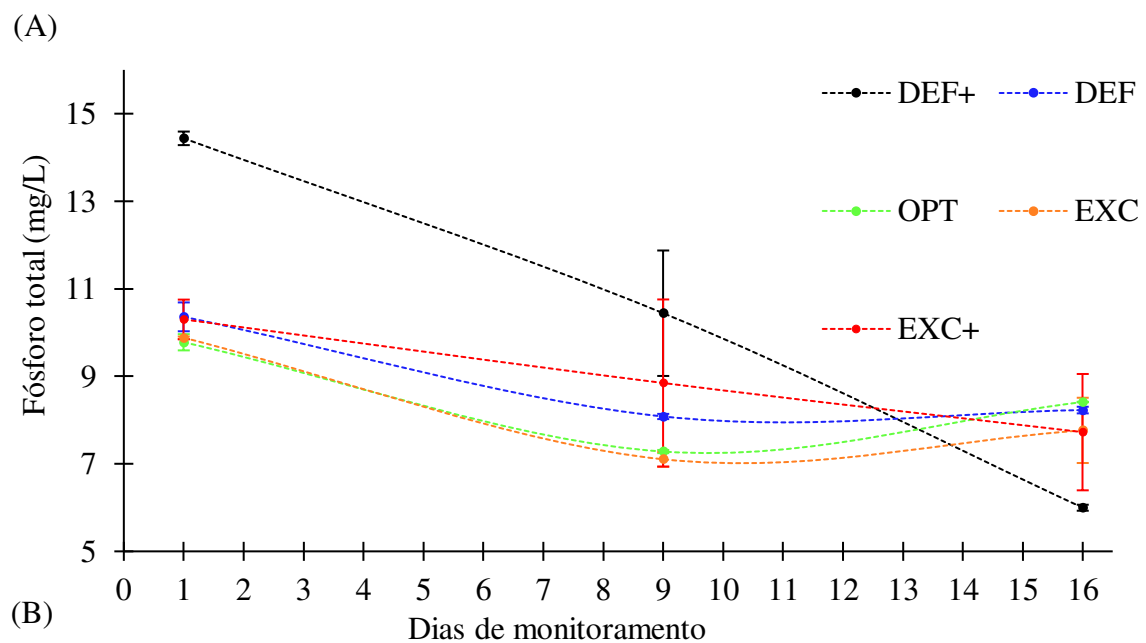


3.3.3. Fósforo

Nas LATs, a remoção de fósforo é influenciada negativamente por diversos fatores: a demanda das microalgas por nitrogênio é maior do que por fósforo, o que pode limitar o crescimento devido à escassez de nitrogênio e cessar a demanda por fósforo; a falta de um estágio anóxico que é exigido pelas bactérias acumuladoras de fósforo; e não elevar o pH a valores que favoreçam a precipitação química ($\text{pH} > 9$) (BEUCKELS; SMOLDERS;

MUYLAERT, 2015; SUTHERLAND et al., 2015; SUTHERLAND; RALPH, 2020). Apenas a precipitação química foi considerada um mecanismo de remoção para a remoção do fósforo total, uma vez que a assimilação por bactérias e microalgas manteria o fósforo nos meios de cultura na composição da biomassa. Houve redução na concentração inicial, e todos os tratamentos mostraram a ocorrência de precipitação química (Figura 8A).

Figura 8. Concentração de fósforo total no meio de cultura durante o monitoramento (A) (barras verticais representam o desvio padrão) e eficiências de remoção (B) (letras entre parênteses diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan a 10% de significância, n =2).



No presente estudo, a remoção total de fósforo (8B) foi significativamente maior ($p < 0,1$) no tratamento DEF+, que atingiu uma eficiência de remoção de 59%. Como não houve diferença significativa entre os demais tratamentos ($p > 0,1$) e o comportamento do pH não explicou essa diferença, é possível concluir que o desempenho superior foi causado pela maior disponibilidade de fósforo no tratamento DEF+.

As concentrações iniciais de fósforo solúvel foram baixas (0,02–0,86 mg/L) e, em alguns casos, a concentração final foi maior que a inicial. As eficiências de remoção foram significativamente maiores ($p < 0,1$) nos tratamentos DEF, OPT e EXC+ (64%, 7% e 54%, respectivamente). O pior desempenho foi obtido pelo tratamento EXC (-1185%), que apresentou a menor concentração inicial e registrou aumento na concentração final. O aumento da concentração de fósforo solúvel pode resultar da adsorção de fósforo às partículas orgânicas nos períodos iniciais da operação. Quando a saturação dos sedimentos é atingida, o teor de fósforo é liberado, aumentando a concentração no meio (KUMAR; MIAO; WYATT, 2010).

4. CONCLUSÃO

As condições nutricionais avaliadas não causaram efeito significativo na produção de clorofila-*a* e biomassa, destacando a capacidade da biomassa de se adaptar às diferentes disponibilidades nutricionais avaliadas neste estudo. Em relação à produtividade da biomassa total, a produtividade foi maior ($p < 0,1$) em DEF+ (7,7 g/m².d) e DEF (7,9 g/m².d), devido à antecipação da ocorrência do pico de clorofila-*a* nestes tratamentos.

As relações C/N e C/P avaliadas neste trabalho obtiveram melhor desempenho de remoção de nitrogênio e fósforo quando o déficit de carbono foi maior (DEF+) e causado pela maior disponibilidade desses nutrientes. Além disso, este tratamento favoreceu a remoção de carbono total em relação aos tratamentos com menor déficit de carbono (DEF e OPT). Os tratamentos com maior disponibilidade de carbono (EXC e EXC+), que receberam o incremento desse nutriente a partir da maior adição da ARIC, obtiveram melhor desempenho de remoção de carbono.

Nenhum tratamento obteve a melhor eficiência de remoção para todas as variáveis, mas dependendo do objetivo, as razões de massa testadas podem direcionar uma possível intervenção. Por fim, a mistura de águas residuárias mostrou-se eficaz como estratégia de intervenção no tratamento. As razões mássicas podem ajudar a direcionar uma variável de interesse a ser removida, uma vez que o crescimento da biomassa não foi afetado entre os tratamentos avaliados. No entanto, houve efeito na eficiência de remoção de nutrientes causado pela variada disponibilidade nutricional.

5. REFERÊNCIAS

ALGAEBASE. Disponível em: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em: 22/1/2022.

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation. 2012.

ASSEMANY, P. P.; CALIJURI, M. L.; TANGO, M. D.; COUTO, E. A. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. **Algal Research**, v. 17, p. 53–60, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.018>>.

DE ASSIS, L. R.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; et al. Evaluation of the performance of different materials to support the attached growth of algal biomass. **Algal Research**, v. 39, n. September 2018, p. 101440, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101440>>.

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; et al. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080>>.

COUTO, E.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P.; CECON, P. R. Evaluation of high rate ponds operational and design strategies for algal biomass production and domestic wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 791, p. 148362, 2021.

COUTO, E. A. ; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; TANGO, M. D.; DA FONSECA SANTIAGO, A. Influence of solar radiation on nitrogen recovery by the biomass grown in high rate ponds. **Ecological Engineering**, v. 81, p. 140–145, 2015.

K. EMERSON, R.E. RUSSO, R.E. LUND, R.V. THURSTON Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature **J. Fish. Res. Board Can.**, 32 (12) (1975), pp. 2379-2383.

GAO, F.; YANG, H. L.; LI, C.; et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, n. January, p. 118–124, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011>>.

GOSWAMI, R. K.; MEHARIYA, S.; VERMA, P.; LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A. Microalgae-based biorefineries for sustainable resource recovery from wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, , n. July, p. 101747, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101747>>.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; JULIEN, L.; et al. Technical potential of microalgal bacterial floc raceway ponds treating food-industry effluents while producing microalgal bacterial biomass: An outdoor pilot-scale study. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 969–979, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.065>>.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012–6018, 2010. Elsevier.

MORILLAS-ESPAÑA, A.; LAFARGA, T.; SÁNCHEZ-ZURANO, A.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. Microalgae based wastewater treatment coupled to the production of high value agricultural products: Current needs and challenges. **Chemosphere**, p. 132968, 2021.

NEDERLANDSE NORM (NEN). NEN 6520. Norma holandesa sobre determinação de clorofila *a* pelo método do etanol, 1981.

NUSH, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Arch. Hydrobiolol**, v. 14, p. 14-36, 1980.

NUNES, Í. L.; AFONSO, R. L. C.; SILVA, B. A. DA; et al. Spatial variability of soil physical properties as a result of different tillage systems. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 42619–42631, 2020.

POSADAS, E.; MORALES, M. DEL M.; GOMEZ, C.; ACIÉN, F. G.; MUÑOZ, R. 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. Elsevier.

RODRIGUES DE ASSIS, L.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, J. S. 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, p. 111183, 2020. Academic Press.

SANTIAGO, A. F.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; CALIJURI, M. D. C.; REIS, A. J. D. DOS. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 34, n. 13–14, p. 1877–1885, 2013.

SILVEIRA, C. F.; ASSIS, L. R. DE; OLIVEIRA, A. P. DE S.; CALIJURI, M. L. Valorization of swine wastewater in a circular economy approach: Effects of hydraulic retention time on microalgae cultivation. **Science of The Total Environment**, v. 789, p. 147861, 2021. Science of the Total Environment. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147861>>

SUTHERLAND, D. L.; HOWARD-WILLIAMS, C.; TURNBULL, M. H.; BROADY, P. A.; CRAGGS, R. J. Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 222–229, 2015. Elsevier.

SUTHERLAND, D. L.; RALPH, P. J. 5 years of research on wastewater treatment high rate algal ponds in New Zealand: discoveries and future directions. , 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tnzb20>>.

USDA 1992, United States Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Washington, D.C. Agricultural Waste Characteristics. In: **Agricultural Waste Management Field Handbook**. p. 40.

UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen der **Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 9, p. 1–38, 1958.

VELOSO, V.; REIS, A.; GOUVEIA, L.; et al. Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2–3, p. 115–119, 1991.

VUPPALADADIYAM, A. K.; PRINSEN, P.; RAHEEM, A.; LUQUE, R.; ZHAO, M. Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 2, p. 304–324, 2018.

XU, J.; WANG, X.; SUN, S.; ZHAO, Y.; HU, C. Effects of influent C/N ratios and treatment technologies on integral biogas upgrading and pollutants removal from synthetic domestic sewage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11207-y>>.

YAN, C.; ZHANG, L.; LUO, X.; ZHENG, Z. Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios. **Ecological Engineering**, v. 51, p. 24–32, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.12.051>>.

ZHENG, H.; LIU, M.; LU, Q.; et al. Balancing carbon/nitrogen ratio to improve nutrients removal and algal biomass production in piggery and brewery wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 479–486, 2018. Elsevier.

ARTIGO 2 – Efeitos da disponibilidade de nutrientes na produção de bioprodutos de valor agregado no tratamento de águas residuárias industriais

RESUMO

O tratamento de água residuárias pela biorremediação com microalgas, além de eficiente na remoção de poluentes, tem o potencial de produção de bioprodutos de alto valor agregado. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e carotenoides tem atraído atenção da devido seu valor econômico e descobertas do benefício do consumo em humanos e animais. A biomassa produzida no tratamento de água residuárias tem potencial de ser utilizada como suplemento na alimentação animal, pela presença de ácidos graxos poli-insaturados, com efeitos anti-inflamatórios e aumento da imunidade, e carotenoides, pelo seu poder antioxidante e pigmentação de produtos. A produção de biomassa pode ser afetada por diversos fatores, como a composição do meio de cultivo. O presente trabalho buscou avaliar a influência das razões C/N/P na produção de biocompostos de alto valor agregado como potencial de utilização na suplementação animal, utilizando águas residuárias da como meio de cultivo. Águas residuárias de indústria alimentícia e de indústria cervejeira foram misturadas em diferentes proporções para se obter variadas razões C/N e C/P. A biomassa foi capaz de produzir ácidos graxos poli-insaturados, e carotenoides em. O potencial de utilização da biomassa diretamente na suplementação animal foi discutido.

1. INTRODUÇÃO

Com potencial de comercialização a valores superiores a 100 €/Kg, a produção de compostos de alto valor agregado pela biomassa cultivada em águas residuárias se mostra promissora. Os produtos de maior interesse são nutracêuticos, cosméticos e farmacêuticos, que incluem carotenoides, ficobiliproteínas, ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos, como esteróis e vitaminas (COSTA et al., 2020).

Quando comparados aos ácidos graxos monoinsaturados, os poli-insaturados possuem capacidade antioxidante maior. A descoberta de efeitos anti-inflamatórios e aumento da imunidade em decorrência do consumo desse composto aumentou o interesse da academia e da indústria acerca da exploração de fontes de ácidos graxos poli-insaturados (LU et al., 2021).

Atualmente a principal produto comercial que contém ácidos graxos poli-insaturados é o óleo de peixe, porém essa fonte é limitada devido ao esgotamento de recursos marinhos, que vem se agravando ao longo do tempo, dada a exploração excessiva destes recursos e da poluição ambiental, que não só contribui para diminuição da disponibilidade de peixes mas também impacta na qualidade dos produtos deles derivados (LU et al., 2021). Nesse contexto, as microalgas surgem como potenciais substitutas já que são as produtoras primárias de ácidos graxos poli-insaturados de ambiente marinho, que se acumulam nos níveis tróficos mais elevados (RAMESH KUMAR et al., 2019).

Quanto aos carotenoides obtidos de microalgas, uma das aplicações na suplementação animal é a pigmentação natural, a adição de microalgas na dieta leva a uma melhora na pigmentação de peixes (PULCINI et al., 2021) e gemas de ovos (LIU et al., 2020). Além disso, outra característica importante é o seu potencial antioxidante, visto que, na indústria da nutrição, a astaxantina chama muita atenção por ser um dos antioxidantes mais potentes que se pode ser obtido da natureza (KALRA; GAUR; GOEL, 2021).

Uma alternativa para reduzir os custos da produção de microalgas para uso na suplementação animal seria utilizar águas residuárias como meio de cultivo alternativo aos meios sintéticos, aproveitando água e nutrientes e produzir uma biomassa valorizada (MALIBARI et al., 2018; SHARMA et al., 2021). A avaliação dos efeitos do uso de microalgas como suplemento na alimentação animal é bastante estudada quando se trata de microalgas produzidas em meio de cultivo sintético, mas ainda há escassez de trabalhos utilizando águas residuárias para obter uma

biomassa para tal finalidade (QUICO; ASTOCONDOR; ORTEGA, 2021; LEE et al., 2019; POSSER et al., 2018).

A disponibilidade de nutrientes é um dos fatores determinantes quando se trata de produção de lipídeos por microalgas. Diversas estratégias são utilizadas para aumentar a produção, como por exemplo, a privação de nitrogênio (BREUER et al., 2012). As razões mássicas de carbono/nitrogênio igual a 6 e carbono/fósforo igual a 48 são desejáveis para o crescimento de microalgas (CHIU et al., 2015). A variação dessas razões também interfere na produção e produtividade lipídica no cultivo de microalgas (GAO et al., 2019).

Diante do exposto, esta proposta tem como foco avaliar as diferentes condições nutricionais do meio de cultivo na produção de biocompostos de alto valor agregado – ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides - e analisar seu potencial de utilização na suplementação animal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Viçosa (UFV), no Município de Viçosa, Estado de Minas Gerais, Brasil (20°45'14''S, 42°52'54''W). O clima do município é classificado como Cwa, segundo Köppen & Geiger, com temperatura média anual de 20,6 °C e pluviosidade média anual de 1229 mm. A umidade relativa do ar média é de 81%. O clima local caracteriza-se como tropical de altitude com verões quentes e chuvosos e invernos frios e secos (NUNES et al., 2020). A biomassa foi produzida no tratamento de águas residuárias realizado nas dependências do Engenharia Sanitária e Ambiental (LESA), onde também foram realizadas as análises de caracterização das águas residuárias. O perfil de ácidos graxos da biomassa produzida foi determinado no Laboratório de Biocombustíveis da UFV.

2.2 Unidade experimental

As etapas de tratamento de águas residuárias e produção de biomassa foram realizadas em lagoas de alta taxa (LATs) em escala reduzida com formato ovalado e divisão central, dotada de 2 canais paralelos. As unidades possuem as seguintes dimensões: 32 cm de largura, 73 cm de comprimento, que resultam em área superficial de 2084 cm². A altura e altura útil são 20cm e 15 cm, respectivamente, com volume útil de 31,96 L. O conjunto de 10 LATs mantém a movimentação do líquido em seus canais com pás de alumínio conectadas à um motor de 1 cv (marca WEG série CFW-10). As unidades estão instaladas em uma casa de vegetação revestida com tela de sombreamento (Sombrite ®) 50%.

2.3 Meio de cultivo

Como meio de cultivo, foram utilizadas água residuária de uma indústria de alimentos (ARIA) e água residuária de uma indústria cervejeira (ARIC). Na indústria de alimentos, existe um sistema de tratamento composto por: grade, flotor, tanque de aeração, decantador e leito de secagem. A ARIA foi coletada na saída do flotor. Já a ARIC, resultante da etapa de fervura do mosto, requereu um tratamento primário antes de ser utilizada no experimento, que consistiu em sedimentação gravitacional por 12h.

2.4 Delineamento experimental

A USDA (1992) recomenda, para o crescimento ótimo da biomassa de microalgas, uma relação mássica C/N igual a 6 e C/P igual a 48. Nesse sentido, segundo Chiu et al. (2015), quando o cultivo de microalgas se dá em águas residuárias, as razões mássicas C/N e C/P podem ser usadas como indicadores de déficit ou superávit de nutrientes. Uma vez que as respostas de crescimento e produção de lipídeos são dependentes da disponibilidade de nutriente, as águas residuárias foram caracterizadas para posterior definição do delineamento experimental. Tabela 3 estão apresentados os valores médios das variáveis avaliadas para caracterização das águas residuárias e dos meios de cultivo utilizados na operação.

Tabela 3. Caracterização das águas residuárias (valores médios, desvio padrão entre parênteses).

Meio de cultivo	Carbono total (mg/L)	Nitrogênio total (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	C/N	C/P
ARIA	371,2 (5,9)	69,2 (0,9)	10,0 (0,3)	5,4 (0,02)	35,0 (0,5)
ARIC	11025,0 (100)	15,6 (0,4)	102,4 (3,9)	707,0 (9,4)	107,0 (3,1)

Sendo assim, o experimento foi delineado com 5 condições de cultivo, ou seja, com diferentes razões de C/N e C/P, tendo como base a recomendação da USDA (1992). Para obter essas diferentes razões, foi realizada a mistura da ARIC com a ARIA em diferentes proporções e foram adicionados ureia (99%, Vetec, Sigma-Aldrich, Brasil ®) e fosfato de sódio dibásico heptahidratado (98%, Vetec, Sigma-Aldrich, Brasil ®) à ARIA. As proporções de ARIC e ARIA em cada mistura, bem como a quantidade necessária de ureia e fosfato de sódio dibásico heptahidratado, foram definidas por balanço de massa, considerando as concentrações requeridas de C, N e P totais para alcançar as razões C/N e C/P previamente definidas. A Tabela 4 apresenta as condições de cultivo (tratamentos), suas respectivas siglas e as proporções, em volume, de ARIA e ARIC utilizadas em cada uma. Os meios de cultivo foram caracterizados após executadas as composições e os resultados da caracterização estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Siglas, condição do meio de cultivo em relação à recomendação da USDA e composição do meio de cultivo.

Sigla	Condição	Meio de cultivo
DEF+	Déficit de carbono superior	100% ARIA com adição de ureia e fosfato de sódio dibásico heptahidratado.
DEF	Déficit de carbono	100% ARIA
OTI	Recomendada	99,5% ARIA e 0,5% de ARIC
EXD	Excesso de carbono	99% ARIA e 1% de ARIC
EXD+	Excesso de carbono superior	98,5% ARIA e 1,5% de ARIC

Tabela 5. Caracterização dos meios de cultivo dos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses).

Meio de cultivo	Carbono total (mg/L)	Nitrogênio total (mg/L)	Fósforo total (mg/L)	C/N	C/P
DEF+	375,7 (7,8)	92,6 (1,5)	14,4 (0,2)	4,1 (0,2)	26,0 (3,4)
DEF	366,7 (2,1)	67,9 (0,6)	10,4 (0,3)	5,4 (0,02)	35,0 (2,4)
OTI	453,8 (3,8)	74,7 (0,7)	9,8 (0,2)	6,1 (0,01)	46,5 (1,8)
EXD	534,6 (8,5)	71,5 (0,6)	9,9 (0,03)	7,4 (0,05)	53,5 (6,27)
EXD+	627,6 (10,7)	76,8 (0,6)	10,3 (0,5)	8,2 (0,15)	61,0 (3,4)

2.5 Condições de cultivo

A radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi monitorada com o radiômetro LI-COR® LI-1500 e a temperatura do meio de cultivo com a sonda da marca Hach, modelo HQ40d a aferição de ambas foi realizada às 12h. A RFA máxima, mínima e média foram 650,8 - 95,3 - 433,1 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^2$, respectivamente. A temperatura dos meios de cultivo máxima, mínima e média foram 21,9 - 19,25 - 20,53 °C.

2.5 Operação

A operação das LATs foi realizada por 16 dias, no outono, entre 8 e 23 de agosto de 2021. No início da operação, o nível de cada LAT foi medido, no ponto médio lateral e transversal do canal, com o auxílio de uma régua e, às 8h de cada dia de operação, água deionizada (GEHAKA®, modelo OS20LXE) foi adicionada às lagoas para que o nível inicial fosse mantido.

O inóculo foi previamente produzido, em cada LAT, com meios de cultivo nas condições determinadas no delineamento experimental. O cultivo dos inóculos foi realizado por 15 dias e, ao final desse período, cada lagoa passou por um processo de sedimentação por 12h, sendo o sobrenadante descartado e a biomassa sedimentada coletada como inóculo. Para cada LAT, a quantidade de inóculo adicionada foi de 10% de seu volume útil (ASSEMANY et al., 2016).

A operação foi finalizada após determinação do decaimento da curva de clorofila-*a*. Após 12h de sedimentação, foi feita a colheita da biomassa para realização das análises de lipídeos e perfil de ácidos graxos.

2.6 Monitoramento

Alíquotas de 200 mL foram coletadas de cada LAT ao início e ao final da operação para realização da caracterização do meio de cultivo. Para essa caracterização, foram analisados carbono total (CT), com o equipamento Shimadzu TOC SSM 5000, nitrogênio total Kjeldahl (4500-N_{org}) e fósforo total (4500-PC), de acordo com seus respectivos procedimentos descritos em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

A cada 4 dias, alíquotas de 200 mL foram coletadas para análises de clorofila-*a*, sólidos suspensos totais (SST) e carotenoides. Os SST foram determinados pelo método (2540E) de acordo com APHA (2012). A clorofila-*a* foi analisada segundo a técnica de extração em etanol 80% a quente, como descrito na norma holandesa (NEDERLANDS Norm, 1981) com base em Nush (1980). Já a concentração de carotenoides foi determinada segundo o procedimento de determinação de pigmentos adaptado de Lichtenthaler (1987). Alíquotas de 10 mL foram adicionadas em tubos Falcon e centrifugados por 5 minutos a 4.000 rpm; o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 10 mL de metanol 99,9% aos tubos e a homogeneização foi feita em Vortex por 5 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados, a 45 °C, no escuro, por 24 horas. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro para os comprimentos de onda de 470, 652 e 665 nm e corrigidas para turbidez pela subtração das absorvâncias no comprimento de 750 nm. A concentração de carotenóides foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$\text{Carotenoides } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(1000(A_{470} - 1,63) * ((16,72A_{665} - 9,16A_{652}) - 104,9) * (34,09A_{652} - 15,28A_{665}))}{221}$$

Equação 2

2.7 Análise da biomassa

A comunidade fitoplanctônica foi caracterizada ao final da operação para verificar quais gêneros e espécies compunham a biomassa. Para tanto, foram coletadas amostras de 50 mL, que foram preservadas em solução de formalina 10%. Estas amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de São Carlos. A caracterização foi realizada em nível de gênero e, para os gêneros dominantes, as espécies presentes foram identificadas. Para a análise quantitativa, os indivíduos foram contados em câmara de sedimentação sob microscópio invertido, utilizando-se o método de Uthermöhl (1958). Para a análise qualitativa, a identificação foi realizada em microscópio invertido, através de caracteres morfológicos e com utilização de referências específicas e bancos de dados “Algaebase”. O biovolume foi determinado a partir da forma geométrica da células e medidas das dimensões de uma amostra de no mínimo 15 indivíduos aleatórios, conforme descrito em MAOTDR (2009). Para a espécie *Chlorella vulgaris* foi utilizada a fórmula do volume de esfera, sendo que o tamanho médio (diâmetro da célula) foi de 4,45 μm (N=20 Desvio padrão (DP) =1,07), resultando no volume de 46,11 μm^3 . Para *Limnothrix planctonica* foi utilizada a fórmula de volume de cilindro sendo os tamanhos médios dos filamentos: largura 2,86 μm (N=15; DP=0,29), comprimento 125 μm (N=15; DP= 51,34) resultado no volume do filamento de 801,43 μm^3 .

As análises de lipídeos e ácidos graxos da biomassa foram realizadas com a biomassa liofilizada. O conteúdo de lipídeos da biomassa foi determinado pelo método de extração Soxhlet (AOAC, 2000). Os lipídeos neutros foram extraídos no determinador de gordura (Tecnal TE-044-8/50) por seis horas, utilizando o hexano 99% como solvente. Após, no mesmo equipamento, os lipídios de membranas foram extraídos com etanol 96% por três horas e, em seguida, quantificados por gravimetria. A produtividade lipídica foi calculada com base na concentração de SST que foi recuperado após o processo de colheita. Que foi determinado pela concentração de STT antes do processo de decantação, descontado a concentração SST do sobrenadante descartado.

Foi realizada a análise da composição de ácidos graxos através de cromatografia gasosa. Para isso, os ácidos graxos foram transesterificados pelo método de Lepage e Roy (1986) com modificações antes de serem analisados por GC. Utilizando uma amostra de *Chlorella* em pó (100mg), adicionou-se uma mistura de metanol/cloreto de acetila (95:5 v/v) e uma solução de padrão interno de ácido heptadecanóico em benzina de petróleo 60°-80°C (5mg/mL, Sigma). A mistura foi selada em um frasco revestido de Teflon, protegido contra luz sob atmosfera de nitrogênio e aquecido a 80°C por 1 hora. Após esfriar até a temperatura ambiente, diluiu-se com água e n-heptano e deixou-se descansar por 15 minutos. A camada superior foi recuperada, seca sobre Na₂SO₄ anidro, filtrada e coletada em um frasco, obtendo-se os ésteres metílicos de ácidos graxos. Esses ésteres foram analisados por cromatografia gasosa em um cromatógrafo Varian 3800 (Palo Alto, Califórnia, EUA) equipado com detector de ionização de chama (FID). A separação foi realizada em uma coluna capilar de sílica fundida Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, Palo Alto, Califórnia, EUA) com hélio como gás de arraste. A temperatura da coluna foi programada em um valor inicial de 200°C por 8 minutos, depois aumentada a 4°C/min até 240°C e mantida por 16 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250°C e 280°C, respectivamente, e a proporção de divisão foi de 1:50 por 5 minutos e 1:10 pelo tempo restante. A pressão da coluna era de 13,5 psi. A identificação do pico e o cálculo do fator de resposta foram realizados usando o padrão GLC-462 (Nu-Chek-Prep, Elysian, Minnesota, EUA). Cada amostra foi feita em duplicata e injetada duas vezes.

2.8 Estatística

As variáveis eficiência da colheita, produção de SST, carotenoides, lipídeos e ácidos graxos foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $\alpha = 10\%$), presumindo experimento em delineamento em blocos casualizados (DBC), com 2 blocos, 5 tratamentos e uma repetição por tratamento. Após a ANOVA, foi aplicado teste de Duncan ($\alpha = 10\%$) para identificar os pares de médias que diferem entre si. As análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2021). E os gráficos foram confeccionados no software Microsoft® Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comunidade fitoplanctônica

A comunidade fitoplanctônica da biomassa ao final da operação, em termos quantitativos, foi composta majoritariamente pela microalga *Chlorella vulgaris*, com a abundância relativa de organismos/mL (%) no intervalo de 95,7-96,4%. Também foi identificada a presença da espécie de cianobactéria *Limnothrix planctonica* em todos os tratamentos, com a abundância relativa variando de 3,4-3,96%, compondo assim, juntamente com a *Chlorella vulgaris*, quase a totalidade dos organismos identificados. Em menor número e não presente em todos os tratamentos, foram identificadas a espécie *Pseudanabaena catenata* e o gênero *Closterium sp.*

A espécie com o maior biovolume na biomassa (59-63 % do biovolume total) foi a *Chlorella vulgaris*. Na Figura 9 está apresentada a porcentagem do biovolume que representa cada espécie identificada nos tratamentos. O biovolume é um resultado importante para elucidar a participação de espécies de dimensões distintas na comunidade (BELLINGER; SIGEE, 2010). No presente estudo, a espécie *Limnothrix planctonica* representou apenas cerca de 3% do número de indivíduos identificados, mas em termos de biovolume representava cerca de 40%.

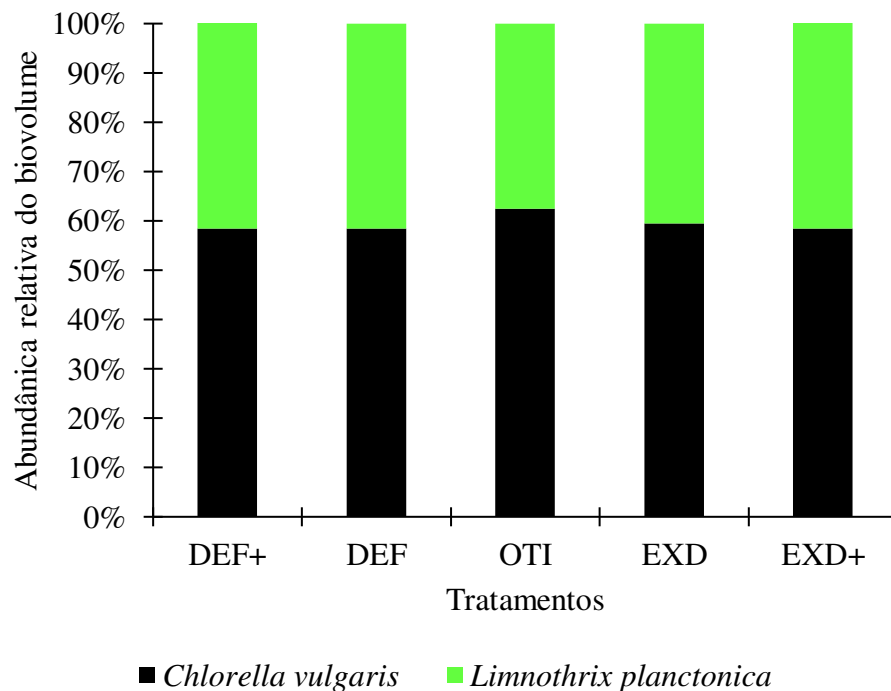


Figura 9. Abundância relativa do biovolume da comunidade fitoplanctônica.

Na perspectiva de produção de lipídeos por microalgas, verifica-se que muitas cepas de microalgas têm a capacidade de acumular grandes quantidades de lipídios na forma de triglicerídeos sob condições de estresse ambiental, como falta de nitrogênio (HU et al., 2008). Entretanto, o conteúdo e a qualidade dos lipídeos variam entre cepas. No trabalho de Breuer et al. (2012), com base em resultados publicados para 96 espécies, os autores selecionaram 9 cepas promissoras para estudar sua biomassa, o total de ácidos graxos e a produção de triacilglicerol (TAGs) em condições de nitrogênio deficiente e suficiente. Em condições de deficiência de nitrogênio, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus obliquus* acumularam mais de 35 % de seu peso seco como TAGs. Contudo, esse aumento de produtividade levou à perda do percentual de insaturação em algumas espécies, como por exemplo, *Chlorella vulgaris* (BREUER et al., 2012).

3.2 Produção de biomassa e eficiência da colheita

A produção de SST no após a colheita está apresentada na Tabela 6. Todos os tratamentos atingiram concentrações de biomassa superiores à 443,25 mg/L o que resulta em uma produtividade de biomassa recuperada superior à 27 mg/L.d.

Tabela 6. Produção de de sólidos suspensos totais recuperada nos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

	Tratamentos				
	DEF+	DEF	OTI	EXD	EXD+
Produção de SST (mg/L)	540,12 ^a (22,4)	556,62 ^a (139,8)	456,2 ^a (83)	443,25 ^a (0,3)	540,12 ^a (3,5)

A concentração de clorofila-*a* está apresentada na Figura 10. Chiu et al. (2009) verificaram que o perfil lipídico de microalgas é variável nas diferentes fases de crescimento. Os autores avaliaram o acúmulo de lipídeos pela microalga *Nannochloropsis oculata* e verificaram que o conteúdo de lipídeos da fase logarítmica para a fase estacionária aumentou de 30,8% para 50,4%. Como estratégia, no presente estudo a operação foi finalizada após o pico da concentração de clorofila-*a*.

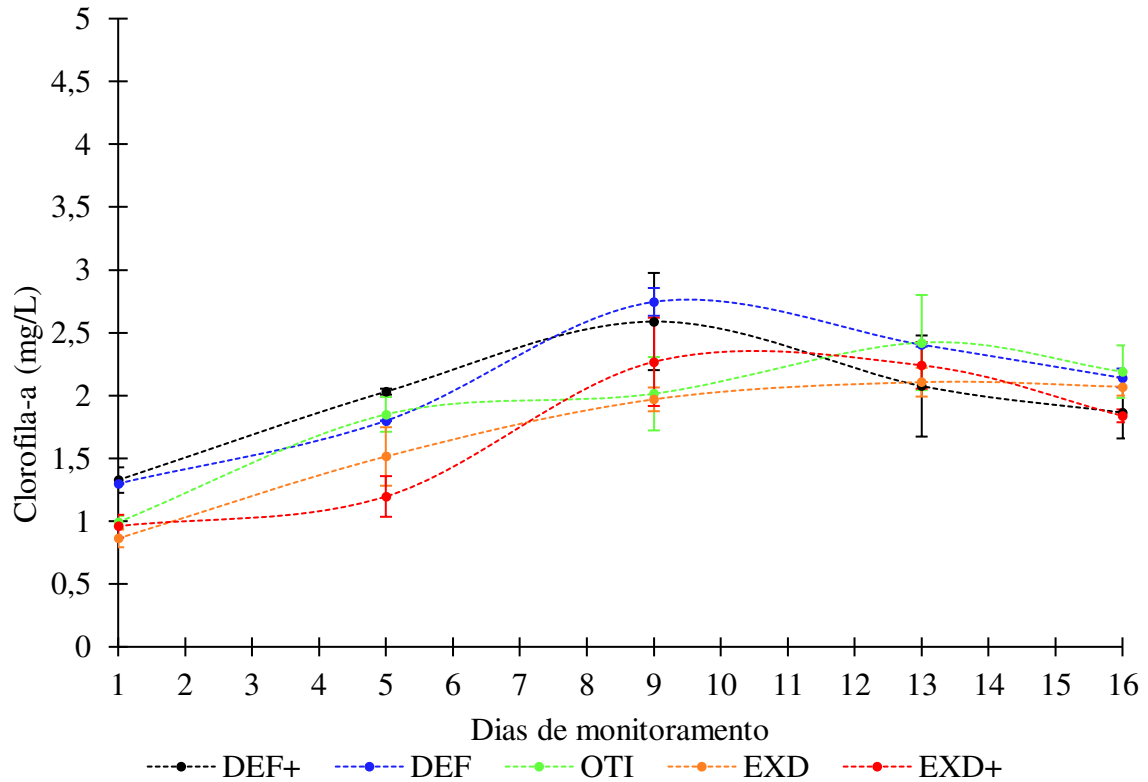


Figura 10. Comportamento da concentração de clorofila-*a* no meio de cultivo ao longo da operação (n=2, barras verticais representam o desvio padrão).

A biomassa colhida após o processo de sedimentação por 12h teve a eficiência da colheita (Tabela 7) variando de 74-94% entre os tratamentos. Houve efeito significativo entre os tratamentos na eficiência da colheita ($p < 0,1$). Os tratamentos DEF+ e DEF, obtiveram eficiências mais elevadas, enquanto EXD+ apresentou a pior performance, indicando que o incremento de ARIA teve efeito negativo nessa etapa do processo da produção de biomassa. A eficiência de colheita torna-se um fator chave na recuperação dos bioprodutos já que a produtividade pode ser negativamente influenciada pela baixa recuperação da biomassa produzida.

Tabela 7. Eficiência da colheita nos tratamentos (%) (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

Tratamentos	Eficiência da colheita
DEF+	91% ^{ab} (2,4)
DEF	94% ^a (0,6)
OTI	86% ^b (2)

Tratamentos	Eficiência da colheita
EXD	84% ^b (1,9)
EXD+	74% ^c (6,6)

O método de colheita aplicado ao presente estudo que foi a sedimentação gravitacional tem como vantagens o baixo custo e o fato de a operação não envolver processos complexos, evitando a contaminação da biomassa, como por exemplo, pelo uso de coagulantes químicos. Por outro lado, tem como desvantagem a demanda por um longo tempo de operação, além de ser dependente da densidade da biomassa para ser eficiente. Além disso, quando comparado a outros métodos, como a centrifugação, tem a eficiência mais baixa (LI et al., 2020). Na perspectiva da utilização da biomassa como suplemento na alimentação de animais, essa etapa torna-se crucial pela necessidade de garantir que a utilização de produtos que aumentem a eficiência dessa etapa não inviabilize a rota.

Mesmo sem a adição de produtos na etapa, os tratamentos com melhor performance (DEF+ e DEF) obtiveram excelentes desempenhos e alcançaram valores comparáveis à trabalhos que avaliaram a eficiência da floculação assistida de *Chlorella vulgaris* pelo floculante orgânico quitosana (RASHID; REHMAN; HAN, 2013; ZHU; LI; HILTUNEN, 2018). Já nos tratamentos com maiores proporções de ARIC, outras técnicas de colheitas são aplicáveis.

3.3 Lipídeos

3.3.1 Acúmulo e produtividade lipídica

A Tabela 8 apresenta o conteúdo de lipídeos (% em peso seco) da biomassa produzida em cada tratamento avaliado. Observa-se a predominância de lipídeos de membrana, compreendendo de 8,9-10,3%, enquanto a fração neutra variou de 0,7-2,1%. Os lipídeos neutros são lipídeos de armazenamento, compreendendo principalmente ácidos graxos saturados e monoinsaturados, enquanto ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa normalmente estão associados à lipídeos de membrana, que são lipídeos estruturais (STEINRÜCKEN et al., 2017).

A produção de lipídeos é amplamente estudada no contexto das microalgas e dentre as condições que influenciam na produtividade, geralmente a disponibilidade de nutrientes é destacada (VIEIRA DE MENDONÇA et al., 2021). No presente estudo, mesmo com disponibilidade de nutrientes, mais especificamente o carbono, sendo o fator estudado, as razões mássicas testadas não causaram efeito significativo na variável ($p > 0,1$).

Os conteúdos de lipídeos totais das biomassas produzida no presente estudo se mantiveram na faixa mais baixa dos valores comumente reportados (10,1-39,3%) para microalgas cultivadas em água residuárias (CHIU et al., 2015). Isso ocorreu provavelmente porque em nenhum tratamento houve condições que induzisse o acúmulo de lipídeos, como por exemplo, a privação de nitrogênio. Além disso, a biomassa que cresce em lagoas de alta taxa com águas residuárias como meio de cultivo é mista, contendo microalgas e bactérias, que acumulam pouco lipídeo e desfavorecem o acúmulo pelas microalgas devido a competição (MEHRABADI; CRAGGS; FARID, 2015).

Tabela 8. Conteúdo de lipídeos em peso seco nos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

Tratamentos	Lipídeos neutros	Lipídeos de membrana	Lipídeos totais
DEF+	0,7% ^b (0,01)	10,3% ^a (2,09)	10,9% ^a (2,10)
DEF	2,1% ^a (0,41)	9,6% ^a (0,44)	11,7% ^a (0,02)
OTI	1,0% ^b (0,11)	9,8% ^a (3,56)	10,8% ^a (3,66)
EXD	1,0% ^b (0,35)	8,9% ^a (0,19)	9,9% ^a (0,16)
EXD+	1,3% ^b (0,01)	9,0% ^a (2,09)	10,3% ^a (2,10)

3.3.2 Produtividade lipídica

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de produtividade lipídica nos tratamentos, considerando o percentual de biomassa que foi recuperada em cada um. Mesmo com a produtividade lipídica sendo calculada levando em consideração a eficiência da colheita, que foi significativamente distinta entre os tratamentos ($p < 0,1$), não houve efeito significativo ($p > 0,1$) na produtividade lipídica entre os tratamentos.

Tabela 9. Produtividade lipídica dos tratamentos (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

	Produtividade lipídica (g/m ² .dia)	Produtividade lipídica (mg/L.dia)
DEF+	0,55 ^a (0,05)	3,68 ^a (0,39)
DEF	0,61 ^a (0,10)	4,08 ^a (0,72)
OTI	0,48 ^a (0,17)	3,17 ^a (1,13)
EXD	0,41 ^a (0,006)	2,74 ^a (0,04)

	Produtividade lipídica (g/m ² .dia)	Produtividade lipídica (mg/L.dia)
EXD+	0,40 ^a (0,058)	2,65 ^a (0,39)

Gao et al. (2019) cultivaram microalgas em águas residuárias sintéticas e avaliaram a influência das razões mássicas de nutrientes na produtividade lipídica. Os autores observaram que em condição fotoautotrófica, a produtividade era inferior à condição mixotrófica. Além disso, quando a razão COT/N era igual a 6, o desempenho era superior à razão COT/N igual a 3. De acordo com os autores, a produtividade lipídica máxima atingida foi superior a 30 mg/L.dia, o que supera de forma expressiva os resultados desse trabalho. Tango et al. (2018) cultivaram microalgas em águas residuárias secundárias da indústria alimentícia (após tratamento biológico) em fotobiorreatores e verificaram que, em 3 operações distintas, a produtividade lipídica variou de 0,3-0,8 g/m².dia, obtendo resultados comparáveis ao do presente estudo.

3.4 Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos da biomassa colhida está apresentado na Tabela 10. Em todos os tratamentos houve predominância de ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos predominantes foram o ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1n9), ácido palmitoleico (16:1) e o ácido alfa-linolênico (18:3n3).

Tabela 10. Perfil de ácidos graxos da biomassa obtida no tratamento de águas residuárias em % (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

±

	DEF+	DEF	OTI	EXD	EXD+
10:0	1,17 ± 0,27	0,73 ± 0,37	0,62 ± 0,18	0,74 ± 0,08	1,31 ± 0,17
12:0	1,42 ± 0,35	1,09 ± 0,49	0,94 ± 0,30	0,82 ± 0,03	0,58 ± 0,03
12:1	4,60 ± 0,38	2,63 ± 0,13	2,98 ± 0,97	3,02 ± 0,05	2,23 ± 0,17
12:2	0,00 ± 0,00	0,56 ± 0,80	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14:0	3,48 ± 0,12	2,15 ± 0,05	2,46 ± 0,78	2,91 ± 0,02	4,12 ± 2,14
14:1	3,93 ± 0,31	3,39 ± 0,39	2,88 ± 0,34	3,13 ± 0,31	1,59 ± 2,24
15:0	0,45 ± 0,14	0,32 ± 0,15	0,35 ± 0,10	0,43 ± 0,02	0,26 ± 0,36
15:1	1,42 ± 0,34	0,95 ± 0,35	1,01 ± 0,29	0,94 ± 0,02	1,37 ± 0,52
16:0	27,92 ± 1,03	30,36 ± 0,51	28,44 ± 3,34	28,23 ± 0,90	28,33 ± 2,01

	DEF+	DEF	OTI	EXD	EXD+
16:1	7,74 ± 0,22	6,84 ± 0,08	6,20 ± 0,45	6,32 ± 0,26	8,14 ± 3,35
16:2	3,89 ± 0,35	3,28 ± 0,13	2,99 ± 0,31	2,95 ± 0,05	2,14 ± 0,21
16:3	3,09 ± 0,47	2,62 ± 0,36	2,36 ± 0,19	2,33 ± 0,18	2,43 ± 0,61
16:4	3,28 ± 0,01	2,21 ± 0,03	2,88 ± 0,16	3,36 ± 0,36	2,66 ± 0,61
18:0	3,09 ± 2,41	6,39 ± 0,89	6,65 ± 0,06	7,23 ± 0,31	8,66 ± 0,97
18:1n9	18,49 ± 1,31	19,76 ± 0,92	21,24 ± 1,24	21,82 ± 0,33	22,44 ± 1,69
18:2	5,60 ± 1,17	7,01 ± 0,19	6,14 ± 0,48	5,93 ± 0,16	4,79 ± 0,83
18:3n3	6,00 ± 0,81	5,58 ± 0,92	4,76 ± 0,71	5,59 ± 0,27	4,02 ± 0,73
18:3n6	0,64 ± 0,08	0,49 ± 0,06	0,89 ± 0,33	0,71 ± 0,05	0,65 ± 0,10
18:4	0,89 ± 0,06	0,87 ± 0,23	1,09 ± 0,15	1,02 ± 0,02	0,91 ± 0,05
20:0	0,06 ± 0,08	0,05 ± 0,07	0,13 ± 0,07	0,13 ± 0,04	0,00 ± 0,00
22:0	0,18 ± 0,25	0,14 ± 0,20	0,18 ± 0,25	0,31 ± 0,05	0,00 ± 0,00
24:0	0,20 ± 0,29	0,18 ± 0,26	0,45 ± 0,13	0,27 ± 0,38	0,00 ± 0,00
24:1	0,70 ± 0,99	0,80 ± 1,14	2,67 ± 1,34	0,13 ± 0,18	0,00 ± 0,00
Desconhecidos	1,75 ± 0,29	1,60 ± 0,84	1,68 ± 0,46	1,68 ± 0,13	3,38 ± 3,48
	2,84% ±	2,50% ±	3,34% ±	3,34% ±	4,23% ±
%AG	0,14% ^{bc}	0,26% ^c	0,39% ^b	0,24% ^b	0,13% ^a
	60,29 +	56,99 +	58,09 +	57,25 +	53,36 +
Insaturados	1,07 ^a	0,32 ^a	2,06 ^a	0,77 ^a	2,21 ^a
	37,97 +	41,41 +			43,26 +
Saturados	1,36 ^a	0,52 ^a	40,20 + 1,6 ^a	41,07 + 0,9 ^a	5,69 ^a

É possível observar que houve um aumento do teor de ácidos graxos conforme a disponibilidade de carbono aumentava. De acordo com Li et al. (2008), em condições limitantes de nitrogênio, a capacidade das células de sintetizar compostos como proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, fica comprometida e, como esses compostos são necessários para o crescimento e divisão celular, a taxa de crescimento torna-se dependente da concentração de nitrogênio intracelular. O crescimento eventualmente cessa, mas, dadas as condições favoráveis, a fotossíntese continua e o fluxo metabólico de carbono assimilado durante a fotossíntese é desviado da síntese de proteínas para a produção de lipídios ou carboidratos (LI et al., 2008).

Entretanto, a alta produtividade lipídica não necessariamente implica em ganhos de produtividade de ácidos graxos poli-insaturados. Em baixas concentrações de nutrientes, a possível

interrupção das vias de dessaturação (inserção de ligação dupla) e alongamento (inserção de pares de carbonos) torna os padrões de ácidos graxos de microalgas mais adequados para a produção de biodiesel. Em contraste, altas entradas de nutrientes aumentam o papel dos conjuntos de enzimas que levam ao acúmulo, tornando a composição de microalgas mais adequada para aquicultura e suplementos nutricionais (FERNANDES et al., 2016).

O aumento da insaturação em decorrência do aumento da disponibilidade de nutrientes já foi estudada por Gao et al. (2019), que cultivaram *Chlorella sp.* em meios de cultivo com diferentes razões de carbono, nitrogênio e fósforo. Os autores observaram que aumentar a razão de carbono/nitrogênio pode aumentar o teor de insaturação, comportamento que foi observado no presente estudo. Em que o tratamento EXD+ teve um percentual de insaturação inferior aos demais tratamentos ($p < 0,1$), mostrando que para as condições testadas nesse estudo, quando $C/N = 8,1$ reduziu-se as vias de dessaturação.

3.5 Carotenoides

A produção de carotenoides no meio de cultivo aumentou em média de 197-222% ao longo da operação. Entretanto, não houve efeito significativo na média de produção entre os tratamentos ($p > 0,1$). A concentração de carotenoides totais aumentou ao longo da operação conforme aumentava o crescimento da biomassa, apresentando a mesma tendência do aumento da concentração de clorofila-*a* (11). Com isso, é possível concluir que o aumento da concentração ocorreu devido ao crescimento da biomassa e não como resposta às diferentes condições nutricionais avaliadas.

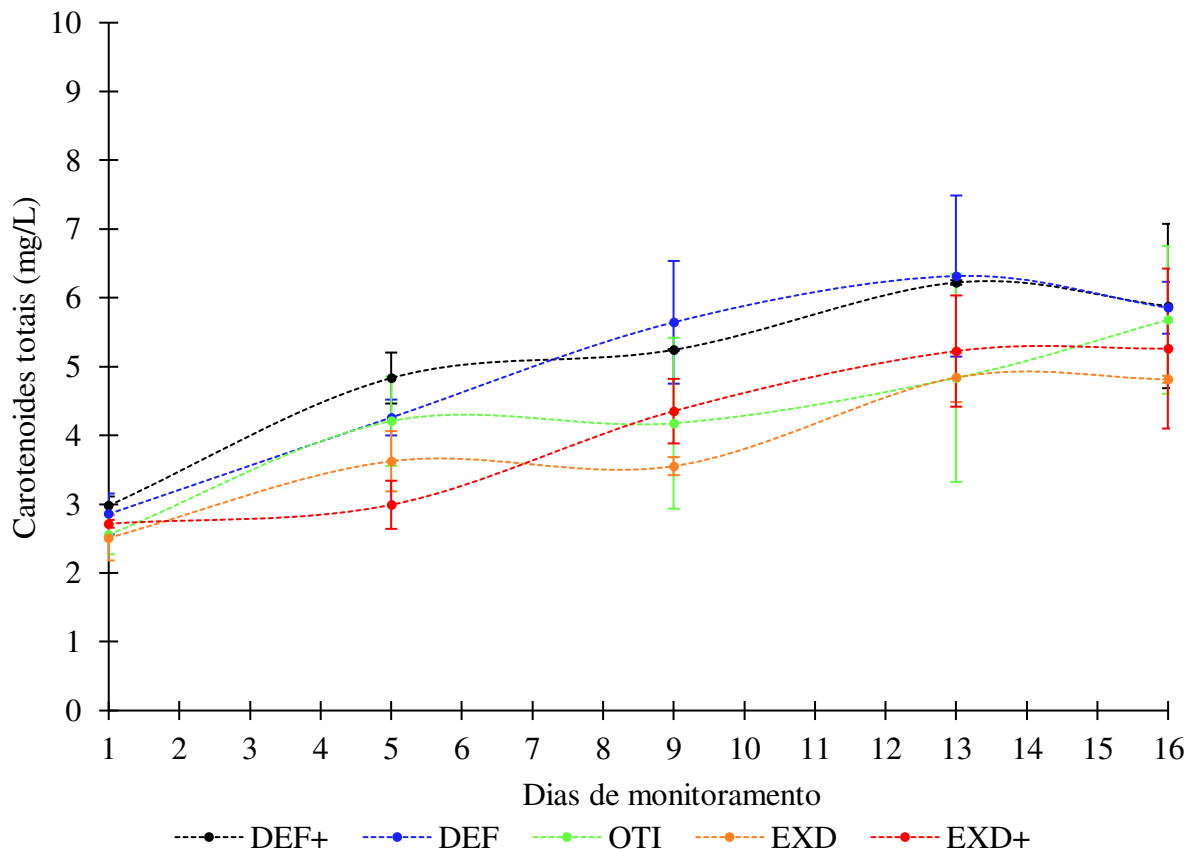


Figura 11. Comportamento da concentração de carotenoides totais durante a operação (n=2, barras verticais representam o desvio padrão).

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da concentração de carotenoides totais da biomassa colhida, a concentração no meio de cultivo ao final da operação e produtividade. Paliwal et al. (2016) estudaram o conteúdo de carotenoides de 57 espécies de microalgas diferentes, pertencentes aos filos *Chlorophyta* e *Cyanophyta*. Os meios de cultivos utilizados eram Meio Basal de Bold, BG11 e Meio Basal de Zarrouk. Foram reportadas concentrações de carotenoides totais de 0,23-7,2 mg/L entre as espécies estudadas. Os resultados do presente estudo são elevados quando comparados à essa faixa, indicando que houve um grande acúmulo de carotenoides. Kalra et al. (2021) já justificaram que o cultivo de biomassa em águas residuárias aumentar o acúmulo de carotenoides devido à limitação de nutrientes ou estresse oxidativo no meio de cultivo. No presente estudo, a limitação de nutrientes não ocorreu durante o cultivo, portanto essa hipótese pode ser descartada.

Tabela 11. Concentração de carotenoides nas biomassas, nos meios de cultivo e produtividades (valores médios, desvio padrão entre parênteses). Letras distintas sobrescritas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan à 10% de significância (n=2).

	Tratamentos				
	DEF+	DEF	OTI	EXD	EXD+
Carotenoides totais (mg/g)	10,1 ^a (2,62)	10,2 ^a (3,25)	11,1 ^a (3,85)	9,2 ^a (0,05)	9,2 ^a (2,86)
Carotenoides totais (mg/L)	5,9 ^a (1,19)	5,9 ^a (0,37)	5,7 ^a (1,07)	4,8 ^a (0,05)	5,3 ^a (1,16)
Produtividade (mg/m ² .d)	55,13 ^a (11,20)	54,9 ^a (3,53)	53,24 ^a (10,06)	45,14 ^a (0,47)	49,34 ^a (10,90)

3.6 Biomassa e potencial na suplementação animal

Em busca da aplicação do conceito de economia circular, para viabilizar a rota de aproveitamento da biomassa de microalgas produzida no tratamento de águas residuárias na suplementação animal, águas residuárias provenientes do processamento de alimentos são um meio de cultivo potencialmente mais seguro que outros. Por exemplo, quando comparadas à águas residuárias municipais, podem conter maiores concentrações de matéria orgânica e sólidos suspensos, mas usualmente contém menores concentrações de patógenos, metais pesados e produtos farmacêuticos (ISOSAARI; HERMANOWICZ; RUBIN, 2010).

As evidências de pesquisas até o momento mostraram que as microalgas podem efetivamente substituir a farinha e o óleo de peixe em dietas para peixes, porcos, aves, coelhos e ruminantes, melhorando tanto o crescimento quanto a qualidade da carne desses animais, isso porque as microalgas possuem vários compostos bioativos que comprovadamente aumentam a imunidade e o estado de saúde dos mesmos, além de proteger os tecidos e possuir efeitos antioxidantes (VALENTE et al., 2021).

A biomassa produzida no presente estudo, apresentou resultados relevantes e mostrou o potencial da rota, bem como seus desafios. No contexto da comunidade fitoplanctônica a identificação da espécie *Chlorella vulgaris* foi um ponto positivo, pois se trata de uma espécie bastante estudada e empregada na suplementação animal, sendo reportados diversos benefícios da sua utilização (KHOLIF et al., 2020; SIKIRU et al., 2019). Um dos desafios identificados foi o crescimento da cianobactéria *Limnothrix planctonica*, que tem potencial de causar efeitos negativos se for ingerida (HUMPAGE et al., 2012) e, em termos de biovolume do fitoplâncton, representou cerca de 40% do biovolume total. Esse resultado aponta para um grande desafio a

ser superado para viabilizar a utilização direta da biomassa produzida em águas residuárias na suplementação animal, uma vez que o controle do crescimento dessas espécies é uma tarefa complexa.

Dentre os compostos produzidos por microalgas os ácidos graxos ω -3 se destacam, pois são reconhecidos como compostos essenciais para humanos e para a maioria dos animais, que não são capazes de sintetizá-los, tornando sua ingestão indispensável para a manutenção da saúde. Por esse motivo, os estudos dos efeitos de utilização de microalgas na suplementação animal concentram-se principalmente nos ácidos graxos ω -3 e ácidos graxos ω -6 (LU et al., 2021; SÁ et al., 2020). Outro composto muito estudado nesse contexto são os carotenoides, que possuem efeitos antioxidantes e tem efeitos positivos na pigmentação de ovos e na carne dos animais (NABI et al., 2020).

4. CONCLUSÃO

A biomassa produzida no tratamento das águas residuárias do presente estudo foi capaz de produzir biocompostos de valor agregado – ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides.

A disponibilidade de nutrientes variada alterou significativamente ($p < 0,1$) o grau de insaturação dos ácidos dos graxos da biomassa, enquanto a produção de carotenoides e conteúdo de lipídeos totais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,1$) nas razões C/N/P testadas.

Os ácidos graxos produzidos pela biomassa têm potencial de impactar positivamente a saúde de animais. Entretanto, foi identificado um gargalo a ser superado caso o aproveitamento seja a utilização direta da biomassa como suplemento, o crescimento de cianobactérias, que em caso de ingestão podem causar danos à saúde dos animais. Ainda, por se tratar de compostos com valor agregado e avanços na pesquisa podem viabilizar a extração desses compostos de forma economicamente viável.

5. REFERÊNCIAS

- Algaebase. Disponível em: <<https://www.algaebase.org>>. Acesso em: 22/1/2022.
- AOAC. **Official methods of analysis**. 11th. ed. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation. 2012.
- ARTEAGA QUICO, C.; MARIANO ASTOCONDOR, M.; AQUINO ORTEGA, R. Dietary supplementation with *Chlorella peruviana* improve the growth and innate immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fingerlings. **Aquaculture**, v. 533, n. October 2020, p. 736117, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736117>>. .
- ASSEMANY, P. P.; CALIJURI, M. L.; TANGO, M. D.; COUTO, E. A. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. **Algal Research**, v. 17, p. 53–60, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.018>>. .
- BELLINGER, E. G. & SIGEE, D. C. 2010. **Freshwater Algae: Identification and Use as Bio-Indicators**. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 271 pp. (cloth), .ISBN 978-0-470-05814-5.
- BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217–226, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.003>>. .
- CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; et al. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 179–189, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080>>. .
- CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; TSAI, M. T.; et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 833–838, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.061>>. .
- CORREIA, B. R.; CARVALHO, G. G. P.; OLIVEIRA, R. L.; et al. Production and quality of beef from young bulls fed diets supplemented with peanut cake. **Meat Science**, v. 118, p. 157–163, 2016. Elsevier.
- COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; MORAES, L.; ZAPAROLI, M.; MORAIS, M. G. Progress in the physicochemical treatment of microalgae biomass for value-added product

recovery. **Bioresource Technology**, v. 301, n. October 2019, p. 122727, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122727>>. .

FERNANDES, T.; FERNANDES, I.; ANDRADE, C. A. P.; CORDEIRO, N. Changes in fatty acid biosynthesis in marine microalgae as a response to medium nutrient availability. **Algal Research**, v. 18, p. 314–320, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.07.005>>. .

GAO, F.; YANG, H. L.; LI, C.; et al. Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 282, n. January, p. 118–124, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.011>>. .

GUIHÉNEUF, F.; SCHMID, M.; STENDEL, D. B. Lipids and Fatty Acids in Algae: Extraction, Fractionation into Lipid Classes, and Analysis by Gas Chromatography Coupled with Flame Ionization Detector (GC-FID); in Dagmar B. Stengel and Solène Connan (eds.), *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1308, DOI 10.1007/978-1-4939-2684-8_11, © Springer Science+Business Media New York 2015

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 621–639, 2008.

HUMPAGE, A.; FALCONER, I.; BERNARD, C.; FROSCIO, S.; FABBRO, L. Toxicity of the cyanobacterium *Limnospira AC0243* to male Balb/c mice. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1576–1583, 2012. Pergamon.

ICHIHARA, K. FUKUBAYASHI, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid Chromatography. *Journal of Lipid Research* Volume 51, 2010. DOI 10.1194/jlr.D001065.

ISOSAARI, P.; HERMANOWICZ, S. W.; RUBIN, Y. Sustainable natural systems for treatment and disposal of food processing wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 662–697, 2010.

KALRA, R.; GAUR, S.; GOEL, M. Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, n. June 2020, p. 101794, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101794>>. .

KHOLIF, A. E.; HAMDON, H. A.; KASSAB, A. Y.; et al. *Chlorella vulgaris* microalgae and/or copper supplementation enhanced feed intake, nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood metabolites and lactational performance of Boer goat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1595–1605, 2020.

LEE, A. V.; YOU, L.; OH, S. Y.; et al. Microalgae supplementation to late gestation sows and

its effects on the health status of weaned piglets fed diets containing high- or low-quality protein sources. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 218, n. August, 2019.

LEMAHIEU, C.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; et al. Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4051–4059, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.078>>. .

LEPAGE, G. AND ROY, C.C. (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **The Journal of Lipid Research**, 27, 114-120.

LI, S.; HU, T.; XU, Y.; et al. A review on flocculation as an efficient method to harvest energy microalgae: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 131, p. 110005, 2020. Pergamon.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 629–636, 2008.

LICHTENTHALER, H. K. [34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350–382, 1987. Academic Press.

LIU, B.; ZHOU, Q.; ZHU, J.; et al. Time course of nutritional and functional property changes in egg yolk from laying hens fed docosahexaenoic acid-rich microalgae. **Poultry Science**, v. 99, n. 9, p. 4616–4625, 2020. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.007>>. .

LU, Q.; LI, H.; XIAO, Y.; LIU, H. A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae. **Algal Research**, v. 55, n. October 2020, p. 102281, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102281>>. .

MALIBARI, R.; SAYEGH, F.; ELAZZAZY, A. M.; et al. Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea – Jeddah. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 160–169, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.037>>. .

MEHRABADI, A.; CRAGGS, R.; FARID, M. M. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 202–214, 2015. Elsevier.

MUDROŇOVÁ, D.; KARAFFOVÁ, V.; KOŠČOVÁ, J.; et al. Effect of fungal gamma-linolenic acid and beta-carotene containing prefermented feed on immunity and gut of broiler chicken. **Poultry Science**, v. 97, n. 12, p. 4211–4218, 2018. Elsevier.

- NABI, F.; ARAIN, M. A.; RAJPUT, N.; et al. Health benefits of carotenoids and potential application in poultry industry: A review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 6, p. 1809–1818, 2020.
- NEDERLANDSE NORM (NEN). NEN 6520. Norma holandesa sobre determinação de clorofila *a* pelo método do etanol, 1981.
- NUNES, Í. L.; AFONSO, R. L. C.; SILVA, B. A. DA; et al. Spatial variability of soil physical properties as a result of different tillage systems. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 42619–42631, 2020.
- NUSH, E. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Arch. Hydrobiolol**, v. 14, p. 14-36, 1980.
- PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; et al. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24–31, 2016. Elsevier.
- POSSER, C. J. M.; ALMEIDA, L. M.; MOREIRA, F.; et al. Supplementation of diets with omega-3 fatty acids from microalgae: Effects on sow reproductive performance and metabolic parameters. **Livestock Science**, v. 207, n. October 2017, p. 59–62, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.006>>. .
- PULCINI, D.; CAPOCCIONI, F.; FRANCESCHINI, S.; et al. Muscle pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets rich in natural carotenoids from microalgae and crustaceans. **Aquaculture**, v. 543, n. April, p. 736989, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736989>>. .
- RAMESH KUMAR, B.; DEVIRAM, G.; MATHIMANI, T.; DUC, P. A.; PUGAZHENDHI, A. Microalgae as rich source of polyunsaturated fatty acids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, n. December 2018, p. 583–588, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.017>>. .
- RASHID, N.; REHMAN, S. U.; HAN, J. I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1107–1110, 2013. Elsevier.
- R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>. 2021.
- REGIONAL., M. DO A. DO O. DO T. E DO D. **Manual para a avaliação da qualidade biológica da água em lagos e albufeiras segundo a directiva quadro da água**. 2009.
- SÁ, M.; FERRER-LEDO, N.; WIJFFELS, R.; et al. Monitoring of eicosapentaenoic acid (EPA) production in the microalgae *Nannochloropsis oceanica*. **Algal Research**, v. 45, n. December 2019, 2020.

- SHARMA, R.; MISHRA, A.; PANT, D.; MALAVIYA, P. Recent advances in microalgae-based remediation of industrial and non-industrial wastewaters with simultaneous recovery of value-added products. **Bioresource Technology**, , n. August, p. 126129, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126129>>. .
- SIKIRU, A. B.; ARANGASAMY, A.; ALEMEDE, I. C.; et al. *Chlorella vulgaris* supplementation effects on performances, oxidative stress and antioxidant genes expression in liver and ovaries of New Zealand White rabbits. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02470, 2019. Elsevier Ltd.
- STEINRÜCKEN, P.; ERGA, S. R.; MJØS, S. A.; KLEIVDAL, H.; PRESTEGARD, S. K. Bioprospecting North Atlantic microalgae with fast growth and high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content for microalgae-based technologies. **Algal Research**, v. 26, p. 392–401, 2017. Elsevier.
- TANGO, M. D.; CALIJURI, M. L.; ASSEMANY, P. P.; DE AGUIAR DO COUTO, E. 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.
- USDA 1992, United States Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Washington, D.C. Agricultural Waste Characteristics. In: **Agricultural Waste Management Field Handbook**. p. 40.
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitteilungen der **Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie**, v. 9, p. 1–38, 1958
- VALENTE, L. M. P.; CABRITA, A. R. J.; MAIA, M. R. G.; et al. Microalgae as feed ingredients for livestock production and aquaculture. **Microalgae**, p. 239–312, 2021. Academic Press.
- VIEIRA DE MENDONÇA, H.; ASSEMANY, P.; ABREU, M.; et al. Microalgae in a global world: New solutions for old problems? **Renewable Energy**, v. 165, p. 842–862, 2021. Pergamon.
- ZHU, L.; LI, Z.; HILTUNEN, E. Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018. BioMed Central. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-018-1183-z>>. .

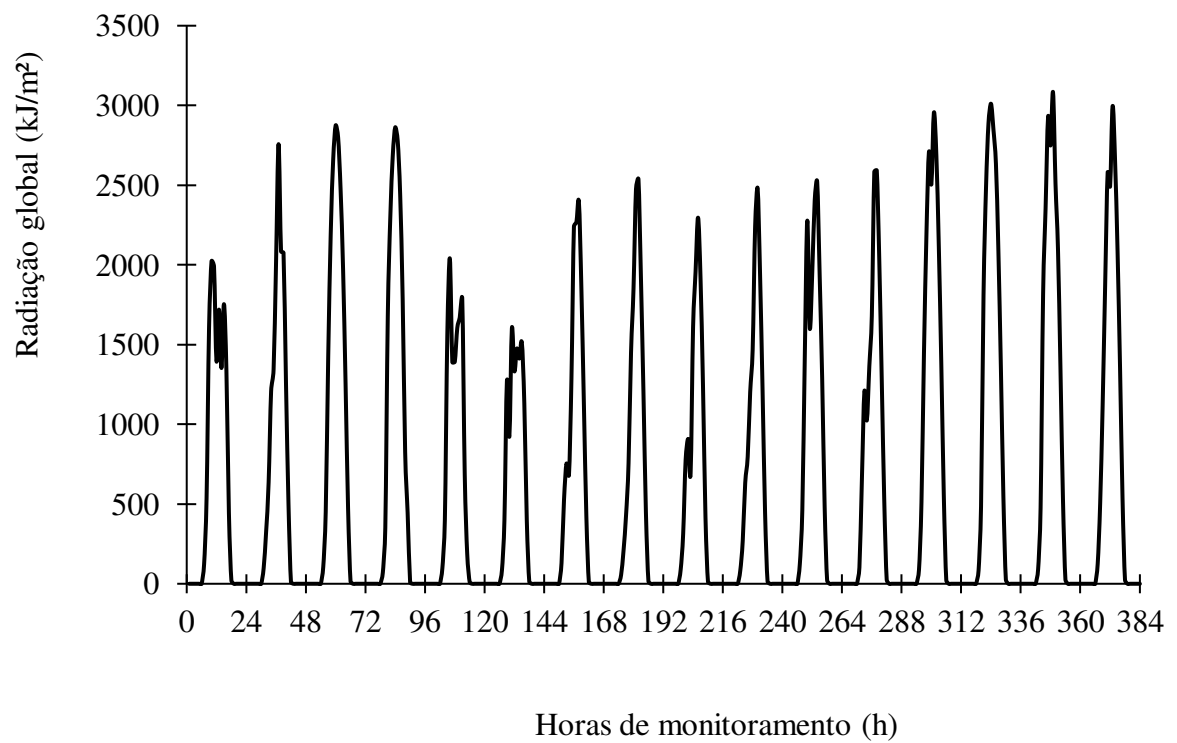
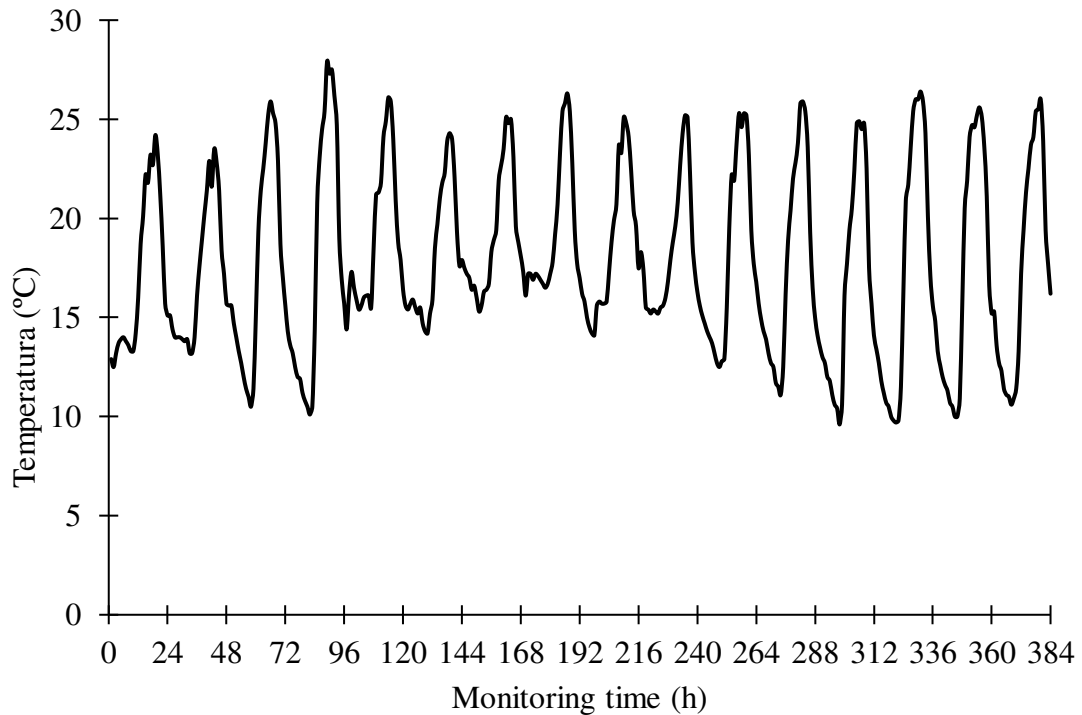
APÊNDICE – Material suplementarFigura 12. Exemplos de *Chlorella vulgaris* (1) e *Limnithrix planctonica* (2).Figura 13. Monitoramento da radiação global (kJ/m²).Fonte: <https://mapas.inmet.gov.br/>

Figura 14. Monitoramento da temperatura do ar (°C).



Fonte: <https://mapas.inmet.gov.br/>.

Tabela 12. Dados da comunidade fitoplanctônica, densidade de indivíduos e biovolume.

Comunidade fitoplanctônica do inóculo (número de indivíduos)			
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Closterium sp.</i>	<i>Limnothrix planctonica</i>
DEF+	55804101,7	12026,7	330735,5
DEF	82311050,0	36080,2	372829,1
OPT	74036648,7	0,0	529176,8
EXC	80434877,6	30066,9	1353008,9
EXC+	55804101,7	12026,7	330735,5
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	<i>Monoraphidium tortile</i>	<i>Selenastrum sp.</i>
DEF+	90200,6	0,0	0,0
DEF	0,0	36080,2	0,0
OPT	0,0	0,0	108240,7
EXC	0,0	0,0	0,0
EXC+	90200,6	0,0	0,0
Comunidade fitoplanctônica do inóculo (%)			
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Closterium sp.</i>	<i>Limnothrix planctonica</i>
DEF+	99,19%	0,01%	0,65%
DEF	99,45%	0,05%	0,46%
OPT	99,73%	0,00%	0,69%

(Continuação) Tabela 13. Dados da comunidade fitoplanctônica, densidade de indivíduos e biovolume.

Comunidade fitoplanctônica do inóculo (%)				
EXC	98,17%	0,03%	1,79%	
EXC+	99,19%	0,01%	0,65%	
Comunidade fitoplanctônica no final da operação (%)				
	<i>Pseudanabaena catenata</i>	<i>Monoraphidium tortile</i>	<i>Selenastrum sp.</i>	
DEF+	0,16%	0,00%	0,00%	
DEF	0,00%	0,05%	0,00%	
OPT	0,00%	0,00%	0,14%	
EXC	0,00%	0,00%	0,00%	
EXC+	0,16%	0,00%	0,00%	
Comunidade fitoplanctônica no final da operação (número de indivíduos)				
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Closterium sp.</i>	<i>Limnothrix planctonica</i>	<i>Pseudanabaena catenata</i>
DEF+	24203826	30066,87	1062363	992206,5
DEF	20992685	0	853899	0
OPT	30054838	0	1082407	72160,48
EXC	35999058	0	1298889	171381,1
EXC+	24203826	30066,87	1062363	992206,5
Comunidade fitoplanctônica no final da operação (%)				
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Closterium sp.</i>	<i>Limnothrix planctonica</i>	<i>Pseudanabaena catenata</i>
DEF+	95,93%	0,12%	3,95%	0,00%
DEF	96,04%	0,00%	3,96%	0,00%
OPT	96,39%	0,00%	3,40%	0,21%
EXC	95,75%	0,00%	3,83%	0,42%
EXC+	95,93%	0,12%	3,95%	0,00%
Fração do biovolume (%)				
	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Limnothrix planctonica</i>		
DEF+	58,5%	45%		
DEF	58,5%	42%		
OPT	62,5%	38%		
EXC	59,5%	41%		
EXC+	58,5%	45%		

Tabela 14. Fração de amônia livre no meio de cultivo durante o monitoramento.

	Fração de amônia livre (%)				
	Dia 1	Dia 5	Dia 9	Dia 13	Dia 16
DEF+	0	10,2	19,7	27,3	31,3
DEF	0	9,4	17,9	20,6	29,5
OPT	0	8,0	16,2	29,6	32,0
EXC	0	6,0	16,0	29,2	26,5
EXC+	0	0,5	6,1	20,8	18,5