



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PRGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

PAULO HENRIQUE DA SILVA

**PÓS-TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO E PRODUÇÃO DE
BIODIESEL COM AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA EM LAGOAS DE
ALTA TAXA**

Recife

2024

PAULO HENRIQUE DA SILVA

**PÓS-TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO E PRODUÇÃO DE
BIODIESEL COM AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA EM LAGOAS DE
ALTA TAXA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Recife
2024

Silva, Paulo Henrique da.

Pós-tratamento de esgoto doméstico e produção de biodiesel com agregados microalga-bactéria em lagoas de alta taxa / Paulo Henrique da Silva. - Recife, 2024.

135 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2024.

Orientação: Maria de Lourdes Florêncio dos Santos.

Inclui referências e apêndices.

1. Agregados microalga-bactéria; 2. Microalgas; 3. Lagoas de alta taxa; 4. Lipídios; 5. Efluentes; 6. Nutrientes. I. Santos, Maria de Lourdes Florêncio dos. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

PAULO HENRIQUE DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Civil. Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Aprovada em 19/12/2024.

BANCA EXAMINADORA

Participação por videoconferência

Prof. Dr. Gustavo Henrique Ribeiro da Silva (Examinador externo)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Participação por videoconferência

Prof.^a Dr.^a Bruna Scandolaro Magnus (Examinadora interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Participação por videoconferência

Prof. Dr. Osmar Menezes (Examinador externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Para Sophia...outra vez. Mais do que nunca.

A meus pais e professores, aqueles sem os
quais nunca poderia chegar aonde cheguei

À solitude que me acompanhou ao longo
dessa jornada, dia sim, dia não.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco, minha *alma mater*, instituição orgulhosamente pública, formadora de profissionais, cientistas e seres humanos.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lourdinha Florêncio, pesquisadora e fonte de admiração de todos. Por todos seus ensinamentos, dedicação ao ensino, energia e por sempre se lembrar de mim, meu mais sincero obrigado.

À FACEPE, pelo indispensável financiamento deste projeto por meio da bolsa de pesquisa. À Compesa e BRK ambiental pela cooperação junto ao LSA e por disponibilizar as instalações da ETE Mangueira para esse estudo. Também à SEAL ambiental, pela concessão do lodo ativado.

Ao grupo algas, Acson, Érika, Iasmin e Rayssa, sem os quais esse trabalho não seria possível. Obrigado pelo interesse, disposição, companheirismo, dedicação e por me ensinarem tanto em tão pouco tempo.

Ao Laboratório de Saneamento Ambiental, em especial nas figuras dos professores Mário Kato, Wanderli Leite, Brunna Magnus, Fabrício Motteran e Sália Gavazza, por seus esforços incansáveis e bem-sucedidos na criação de uma casa formadora de grandes mentes e laços.

A todos os meus amigos de LSA, especialmente Iago, Dicla, Elissandra, Thalita, Henrique, Bianca, Danúbia, Fabrício, Ronaldo e todos os outros que direta ou indiretamente me ajudaram e estiveram comigo no dia a dia. Em especial, à Tonho, por ser um grande professor e amigo, sempre disposto a me ajudar quando preciso, à distância ou presencialmente.

A meus pais, Alonso e Márcia, por serem bastiões de segurança e conforto, símbolos de seres humanos e por me ensinarem a importância do conhecimento. A meus irmãos, Suziane e João, por tornarem a vida mais leve e feliz. À Sophia, por continuar me ensinando tanto sobre mim mesmo.

À Thais, namorada, companheira e conselheira, por todo seu apoio emocional, carinho e amor nessa jornada, desde muito antes do seu início e até muito depois do seu fim.

À Amanda, Émerson, Ramon, Ítalo e Zé, fiéis e queridos amigos, por todo o apoio emocional, brincadeiras, risadas, conversas e tantos momentos memoráveis.

A todos esses, meus sinceros agradecimentos.

É provável que a raça humana acabe um dia e que novas espécies dominem este planeta. A Humanidade pode não ser eterna, mas ainda temos a responsabilidade de deixar os rastros de vida que pudermos. Construir o futuro e manter o passado vivo são a mesma coisa (Metal [...], 2011, tradução própria).

RESUMO

Agregados de microalgas e bactérias (AMAB) destacam-se como uma solução promissora para o tratamento de esgotos e a produção de biodiesel de alta qualidade. Este trabalho avaliou o desempenho de uma lagoa de alta taxa (LAT) em escala piloto (2.400 L) operada em regime de batelada sequencial (BS), utilizando esgoto doméstico pré-tratado anaerobicamente como meio de cultivo. Foram analisadas a remoção de nutrientes, a dinâmica dos gêneros de microalgas, a sedimentabilidade do lodo, o rendimento lipídico por diferentes metodologias de extração e a qualidade do biodiesel produzido. A operação em BS iniciou no 20º dia, após a formação da biomassa. Com um tempo de detenção hidráulica (TDH) de 4 dias e troca volumétrica de 50% a cada 2 dias, observou-se a substituição do gênero *Desmodesmus* sp. por *Cyclotella* sp., que se tornou predominante (80%) entre os dias 66 e 128, influenciada pelas condições operacionais e pela composição do esgoto. A presença de *Cyclotella* sp. resultou em um valor pH próximo à neutralidade, o que favoreceu a proliferação de zooplânctons (*Daphnia* sp.), impactando a eficiência do tratamento nos dias finais. Ainda assim, a LAT obteve remoções expressivas de nitrogênio amoniacal (90,0%) e DQO total (66,6%). O rendimento lipídico foi avaliado por três metodologias: Soxhlet (SO), Folch, Lees e Stanley (FO) e Bligh e Dyer (BD). O método SO apresentou o maior rendimento (12,2%), e tanto SO quanto FO geraram perfis mais estáveis de ácidos graxos (C16:0, C18:1 e C18:2), ideais para biodiesel. O biodiesel produzido apresentou número de cetano acima dos limites mínimos do Brasil (48) e da União Europeia (52), além de valor de iodo abaixo do máximo permitido pela ANP (120 $gI_2/100g$). Os resultados indicam que a operação de uma LAT em BS é uma alternativa eficiente para a biorremediação de esgotos domésticos e a produção de biocombustíveis. O sistema produziu biomassa sedimentável e lipídios de alta qualidade, embora a proliferação de zooplânctons aponte a necessidade de estratégias de controle para garantir a estabilidade do sistema no longo prazo.

Palavras-chave: Agregados microalga-bactéria; microalgas; Lagoas de Alta Taxa; Lipídios; Efluentes; Nutrientes.

ABSTRACT

Microalgae-bacteria aggregates (AMAB) stand out as a promising solution for wastewater treatment and the production of high-quality biodiesel. This study evaluated the performance of a pilot-scale (2,400 L) high-rate algal pond (HRAP) operated in a sequential batch (SB) regime, using anaerobically pre-treated domestic sewage as the cultivation medium. Nutrient removal, the dynamics of microalgae genera, sludge sedimentability, lipid yield extract from different methodologies and the quality of the biodiesel produced were analyzed. The BS operation began on the 20th day after the biomass was formed. With a hydraulic detention time (HRT) of 4 days and a volume change of 50% every 2 days, the genus *Desmodesmus* sp. was replaced by *Cyclotella* sp., which became predominant (80%) between days 66 and 128, influenced by the operating conditions and the composition of the medium. The presence of *Cyclotella* sp. resulted in a pH value close to neutral, which favored the proliferation of zooplankton (*Daphnia* sp.), impacting the efficiency of the treatment in the final days. Even so, the HRAP achieved significant removals of ammoniacal nitrogen (90.0%) and total COD (66.6%). The lipid yield was assessed using three methodologies: Soxhlet (SO), Folch, Lees and Stanley (FO) and Bligh and Dyer (BD). The SO method showed the highest yield (12.2%), and both SO and FO generated more stable fatty acid profiles (C16:0, C18:1 and C18:2), ideal for biodiesel. The biodiesel produced had a cetane number above the minimum limits for Brazil (48) and the European Union (52), as well as an iodine value below the maximum allowed by the ANP (120 gI₂/100g). The results indicate that the operation of a LAT in BS is an efficient alternative for the bioremediation of domestic sewage and the production of biofuels. The system produced high-quality sedimentable biomass and lipids, although the proliferation of zooplankton points to the need for control strategies to ensure the long-term stability of the system.

Keywords: Microalgae-Bacteria Aggregates; Microalgae; High-Rate Algal Ponds; Lipids; Effluents; Nutrients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemas dos tratamentos de esgoto clássicos. Na ordem: Sistema aeróbrio (A), Reator anaeróbio de fluxo ascendente (B), Sistema se nitrificação/desnitrificação e (D) Sistema anaeróbio/aeróbio de RBF.	25
Figura 2 - Esquema básico de célula de microalga.	26
Figura 3 - Exemplos de microalgas típicas, como a diatomácea cêntrica <i>Thalassiosira allenii</i> (A), a euglenóide <i>Phacus curvicauda</i> (B), células de <i>Botryococcus braunii</i> envoltas em matriz orgânica de hidrocarbonetos extracelulares (C) e célula de <i>Dunaliella salina</i> (D).	28
Figura 4 - Esquema simplificado de biorrefinaria à base de microalgas.	35
Figura 5 - Esquema básico de uma lagoa de alta taxa para o cultivo de microalgas.	38
Figura 6 - Mecanismos ponte (A) e preenchimento (B) para a captura das células de microalgas pelo EPS.	44
Figura 7 - Gerações de biocombustíveis.	52
Figura 8 – Estrutura básica de um triacilglicerol e seus tipos de ácidos graxos formadores possíveis.	53
Figura 9 – Síntese de Triacilgliceróis nas organelas celulares das microalgas via rota autotrófica.	54
Figura 10 - Reação de transesterificação utilizada na produção do biodiesel algal.	56
Figura 11 – Esquema do processo de produção padrão do biodiesel algal. ...	57
Figura 12 - Fluxograma de alimentação de esgoto na lagoa e procedimento experimental seguido.	61
Figura 13 - Lagoa de alta taxa operada durante o estudo.	62
Figura 14 - Esquema de coleta amostral da LAT durante a operação em batelada sequencial (Fase 2).	66
Figura 15 - Etapas da extração de lipídios da biomassa AMAB: Colheita (A), concentração (B), secagem e moagem (C), extração por BD ou FO (D) e Soxhlet (E) e rotaevaporação do extrato.	75
Figura 16 - Perfil de precipitação, temperatura e radiação durante o experimento (Fev/2023 a Jul/2023), obtidos a partir de estação meteorológica e <i>in situ</i>	79

Figura 17 - Liqueur misto da lagoa após 30 minutos de sedimentação no início (a) e fim (b) da Fase 1 de operação.	83
Figura 18 - Registros microscópicos da Fase 1 de operação. Na ordem: Lodo ativado de inóculo (a); aparecimento (b) e desenvolvimento (c) das primeiras microalgas filamentosas, atuantes no suporte do floco; células de Gomphonema sp. (d) e Desmodesmus sp. (e); agregado microalga-bactéria bem desenvolvido ao final de 20 dias (f).....	84
Figura 19 - Abundância relativa de gêneros algais ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.....	85
Figura 20 - Células de <i>Desmodesmus</i> sp. (a) e <i>Cyclotella</i> sp. (b, circuladas em vermelho).	86
Figura 21 - Abundância relativa média dos gêneros algais dominantes no período dos dias 66 a 128.....	87
Figura 22 - Dados de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e teor de clorofila-a por grama de SSV obtidos ao longo do experimento.	88
Figura 23 - Valor de pH e oxigênio dissolvido medidos in situ na LAT nas Fases 1 e 2.	89
Figura 24 - Perfil de gêneros de zooplânctons encontrados no dia 135 após o início do pastoreio.	91
Figura 25 - Perfil de remoção de DQO solúvel ao longo das Fases 1 e 2.	92
Figura 26 - Perfil de remoção de DQO total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.....	93
Figura 27 - Perfil de remoção de fósforo total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.....	95
Figura 28 - Perfil de remoção de nitrogênio amoniacal ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.....	96
Figura 29 - Perfil de remoção de nitrogênio total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.....	96
Figura 30 - Perfil de nitritos de nitratos ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.	97
Figura 31 - Suposição do comportamento de lagoas de alta taxa perante microalgas com tipos diferentes de sedimentabilidade: (A) Operação em regime contínuo; (B) Início de cada ciclo de operação em Batelada sequencial.	101

Figura 32 - Proposição das interações ocorridas na LAT operada em batelada sequencial e que levaram à manutenção de um perfil algal constante do dia 66 a 128.	102
Figura 33 - Perfil do EPS tipo polissacarídeos e proteínas e seus respectivos quocientes com relação aos valores correspondentes de SSV.	104
Figura 34 - Acompanhamento de IVL30 e Eficiência de sedimentação do lodo AMAB produzido na LAT ao longo do experimento.	105
Figura 35 - Sedimentação do liquor misto da LAT após 30 minutos nos dias 30 (A), 44 (B), e 100 (C) e comparação do efluente (EF) com água potável nos dias 44 (D) e 100 (E).	106
Figura 36 - Variação de granulometria do AMAB encontrado no liquor misto da lagoa ao longo do experimento.	107
Figura 37 - Teor de lipídio obtido por meio das 3 metodologias operadas. BD - Bligh; Dyer (1957); FO - Folch; Lees; Stanley, (1957); SO – Soxhlet.	108
Figura 38 - Perfil de ácidos graxos ao longo do experimento obtidos à partir das três metodologias avaliadas.	110
Figura 39 - Números de Cetano do Biodiesel obtido a partir das metodologias de extração avaliadas.	112
Figura 40 - Valor de lodo do Biodiesel obtido a partir das três metodologias avaliadas.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos do uso de agregados microalga-bactéria no tratamento de efluentes.....	49
Tabela 2 – Teor lipídico encontrado em alguns tipos de microalgas.	55
Tabela 3 - Parâmetros construtivos da lagoa de alta taxa utilizada.	62
Tabela 4 – Parâmetros operacionais do sistema de agitação.....	63
Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do lodo utilizado na formação da biomassa AMAB.....	63
Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do efluente pré-tratado por UASB.....	64
Tabela 7 - Parâmetros in situ medidos na lagoa.	67
Tabela 8 - Dados físico-químicos analisados nas fases 1 e 2.....	67
Tabela 9 - Parâmetros de controle do esgoto afluente e no início e final da Fase 1 do experimento.....	80
Tabela 10 - Teor médio de FAMES de interesse obtidos à partir das 3 metodologias avaliadas.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
AMAB	Agregados Microalgas-Bactérias
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BS	Batelada Sequencial
CA	Carbono Anidrase
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EPS	Material Polimérico Extracelular
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAME	Metil ésteres de ácidos graxos
IPCC	Painel Intergovernamental para as Mudanças Climáticas
IVL	Índice Volumétrico de Lodo
LAT	Lagoa de Alta Taxa
MCC	Mecanismo de Concentração de Carbono
NC	Número de Cetano
NTK	Nitrogênio Total de Kjeldahl
OD	Oxigênio Dissolvido
PAO	Organismos acumuladores de fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	Polihidroxialcanoatos
RBFA	Remoção Biológica de Fósforo Assistida
RNA	Ácido Ribonucleico
RuBisCO	Enzima Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxidase
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TAG	Triacilgliceróis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
TN	Nitrogênio Total
VI	Valor de lodo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	OBJETIVO GERAL	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1	SISTEMAS CLÁSSICOS DE TRATAMENTO.....	20
3.1.1	Processos aeróbios – Lodo Ativado	21
3.1.2	Processos anaeróbios – UASB	22
3.1.3	Outros processos de tratamento de esgoto	23
3.1.3.1.	Nitrificação e Desnitrificação	23
3.1.3.2.	Remoção Biológica de Fósforo (RBF).....	24
3.2	MICROALGAS	26
3.2.1	Classificação das microalgas	26
3.2.2	Biologia e metabolismo de microalgas	28
3.2.3	Metabolismo do carbono nas microalgas	29
3.2.3.1	Captura de carbono e energia	29
3.2.3.2	Mecanismo de concentração de carbono (MCC).....	30
3.2.3.3	Alcalinização fotossintética	32
3.2.4	Aplicações das microalgas	33
3.2.3.1	Biorrefinaria algal	34
3.2.3.2	Tratamento de efluentes	35
3.3	MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROALGAS	36
3.3.1	Sistemas fechados	36
3.3.2	Sistemas abertos	37
3.3.3	Lagoas de alta taxa (LAT)	38
3.3.3.1	Parâmetros químicos	39
3.3.3.2	Parâmetros físicos	40
3.3.3.3	Parâmetros biológicos.....	40
3.3.4	Tipos de regimes de operação	41
3.4	AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA	43
3.4.1	Desvantagens dos sistemas algais	43
3.4.2	Autofloculação e biofloculação	44

3.4.3	Biologia e metabolismo dos AMAB	45
3.5	APLICAÇÕES DE AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA NO TRATAMENTO DE EFLUENTES	46
3.6	BIODIESEL ALGAL	51
3.6.1	Crise energética, mudanças climáticas e biocombustíveis	51
3.6.2	Lipídios de microalgas	53
3.6.3	Biodiesel algal e transesterificação	56
3.6.4	Microalgas como fonte de Biodiesel – LAT+AMAB	58
4.	METODOLOGIA	61
4.1.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	61
4.2.	PARÂMETROS DA LAGOA E DE MISTURA.....	62
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DO INÓLUCO	63
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	64
4.5.	FASE 1 – FORMAÇÃO DA BIOMASSA.....	64
4.6.	FASE 2 – OPERAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL	65
4.7.	MÉTODOS ANALÍTICOS	66
4.9.1.	Parâmetros <i>in situ</i>	66
4.9.2.	Remoção de matéria orgânica e nutrientes	67
4.8.	FORMAÇÃO DA BIOMASSA	67
4.8.1.	Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	68
4.8.2.	Identificação e quantificação celular	68
4.8.3.	Clorofila-a	69
4.8.4.	Granulometria	70
4.8.5.	IVL30	70
4.8.6.	Eficiência de floculação	71
4.8.7.	Substâncias poliméricas extracelulares	71
4.8.7.1.	Polissacarídeos.....	72
4.8.7.2.	Proteínas.....	72
4.9.	AVALIAÇÃO LIPÍDICA	73
4.11.1.	Extrações e quantificação lipídicas	73
4.11.2.	Derivatização e análise cromatográfica	75
4.11.3.	Análises de número de cetano e número de iodo	77
4.10.	VARIAÇÕES METEOROLÓGICAS	78
4.11.	MÉTODOS GRÁFICOS E ESTATÍSTICOS.....	78

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1.	DADOS METEOROLÓGICOS.....	79
5.2.	FASE 1 - FORMAÇÃO DOS AMAB	80
5.3.	FASE 2 – OPERAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL.....	85
5.2.1.	Identificação e quantificação dos gêneros de microalgas	85
5.2.2.	pH, OD e pastoreio Zooplantônico	89
5.2.3.	Desempenho do tratamento.....	92
5.2.3.1.	Remoção de Carbono	92
5.2.3.2.	Remoção de Fósforo.....	94
5.2.3.3.	Remoção de Nitrogênio	96
5.2.4.	Dinâmica de sucessão ecológica	99
5.2.5.	Material Polimérico Extracelular (EPS)	103
5.2.6.	IVL30 e Eficiência de Floculação	105
5.2.7.	Granulometria do Flocos Microalga-Bactéria.....	107
5.4.	PERFIL DE LIPÍDIOS E DESEMPENHO DO BIODIESEL.....	108
5.3.1.	Teor de Lipídios <i>versus</i> metodologias de extração	108
5.3.2.	Perfil de Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAMES).....	109
5.3.3.	Desempenho do Biodiesel	112
6.	CONCLUSÕES.....	114
7.	RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	116
	REFERÊNCIAS.....	117
	APÊNDICE A – METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS AVALIADOS	131
	APÊNDICE B – TESTES ESTATÍSTICOS DA FASE 2.....	132
	APÊNDICE C – PARCELA DE FAMES ESPECÍFICOS OBTIDOS.....	133

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas e o consumo intensivo de combustíveis fósseis elevaram as concentrações dióxido de carbono atmosférico aos maiores níveis registrados em 2 milhões de anos. Caso o efeito estufa decorrente não seja contido em um limite de 1,5 °C até 2050, segundo o sexto relatório do IPCC (2023), os resultados no clima da terra serão catastróficos. Por isso, é imprescindível não apenas reduzir as emissões para um limite de 510 gigatoneladas de CO₂, mas também implementar com urgência tecnologias de captura de carbono, como a produção e uso de biocombustíveis (IPCC, 2023).

A primeira geração de biocombustíveis baseia-se nas culturas agrícolas de larga escala, como milho e cana-de-açúcar. Embora eficientes, essas culturas competem com a produção de alimentos (Bharti et al., 2021). A segunda geração, por sua vez, utiliza biomassa lignocelulósicas, como grama e resíduos agrícolas, mas também enfrenta desafios logísticos e técnicos. A terceira geração tenta superar todas essas limitações ao fazer uso de microalgas, organismos que não necessitam de água de qualidade nem grandes extensões de terra férteis e apresentam alta produtividade. Tais propriedades tornam as microalgas uma das matérias-primas mais promissoras e estudadas para a produção sustentável de biocombustíveis (Wang et al., 2024).

O termo “microalga” abrange um amplo grupo de procariontes e eucariontes unicelulares ou coloniais, cosmopolitas e fotossintetizantes (Borowitzka, 2018; Lévassieur; Perré; Pozzobon, 2020). Esses organismos consomem grandes quantidades de nutrientes, como nitrogênio e fósforo que, se presentes em excesso no ambiente, podem causar eutrofização. Entretanto, quando aplicadas de maneira controlada, as microalgas tratam efluentes, prevenindo os efeitos deletérios do descarte inadequado de esgotos no ambiente, um dos problemas mais desafiadores das metrópoles do século 21 (Debeni Devi et al., 2023; Dos Santos Neto et al., 2021).

A biomassa algal é rica em compostos de alto valor agregado, como carboidratos, proteínas, enzimas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos (Okeke et al., 2022). Dentre as formas de cultivo de microalgas mais eficiente e versátil destacam-se as lagoas de alta taxa (LAT), que utilizam calhas onde hélices mantêm a homogeneização e movimentação da massa líquida interna (Lizzul; Allen, 2017). Esses sistemas se destacam pelo baixo custo, simplicidade operacional e amplo

conhecimento técnico e científico acumulados, tornando-se a opção mais econômica para a produção de bioenergia (Maliha; Abu-Hijleh, 2023; Pandey *et al.*, 2024).

Entretanto, altas repulsões eletrostáticas dificultam a agregação das células algais o que faz da etapa de colheita o processo mais oneroso, respondendo por 20 a 30% do custo de produção (Mata; Martins; Caetano, 2010). Uma solução eficiente é o cultivo simbiótico com bactérias, o que induz a produção de uma matriz gelatinosa de polímeros catiônicos capaz de neutralizar as cargas e formar agregados de microalgas e bactérias (Keshinro *et al.*, 2024). Esse consórcio, apresenta maior sedimentabilidade e possui a capacidade de tratar esgotos de diferentes tipos mais completamente, graças ao oxigênio fornecido à respiração heterotrófica (Sátiro, 2021).

A aplicação de agregados AMAB em lagoas de alta taxa se mostra altamente promissora na produção de bioenergia. Os óleos extraídos das microalgas podem passar por reações de transesterificação, originando ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeias curtas, um biodiesel facilmente aplicável nos motores atuais (Pandey *et al.*, 2024; Tüccar; Aydin, 2013). Entretanto, ainda existem lacunas no conhecimento da aplicação de agregados microalga-bactéria em LAT, tais como as variações que ocorrem nos lipídios ao longo do tempo em sistemas piloto e reais.

Outro fator relevante é o regime hidrodinâmico de operação. Normalmente, as LAT funcionam em fluxo contínuo, mas estudos indicam que o regime descontínuo, também chamado de batelada sequencial, pode oferecer ganhos na produtividade. Nesse regime, o crescimento das algas é mantido em fase exponencial por mais tempo, reduzindo as perdas por autossombreamento (Tan *et al.*, 2014). Apesar de ser apontada como economicamente viável quando aplicada à produção de bioenergia, ainda são poucos os dados encontrados na literatura sobre seu desempenho, em especial em sistemas em escala piloto e real (Ho *et al.*, 2014).

Em resumo, a aplicação de sistemas de lagoas de alta taxa é altamente promissora no tratamento de efluentes tratados ou brutos. Além disso, a biomassa de agregados alga-bactéria melhora a colheita, facilitando a obtenção de subprodutos energéticos como os lipídios, insumos do biodiesel. A adoção do regime de batelada sequencial pode ampliar o alcance desses sistemas. Porém, são necessários estudos que avaliem sua viabilidade prática, o que inclui o acompanhamento dos perfis lipídicos e o desempenho do tratamento ao longo do tempo.

2. OBJETIVOS

Nesta seção, são apresentados os objetivos gerais e específicos da presente pesquisa.

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de agregados microalga-bactéria cultivados a partir de lodo ativado em uma lagoa de alta taxa (LAT) em escala piloto sob regime hidrodinâmico de batelada sequencial (BS), tendo em vista o tratamento do esgoto usado como meio de cultura e a produção de biodiesel a partir dos lipídios extraídos da biomassa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a remoção de nutrientes do esgoto doméstico na LAT ao longo de 171 dias, permitindo verificar a resiliência do tratamento em BS;
- b) Verificar as dinâmicas de gênero ocorridas na lagoa de maneira a melhor compreender a simbiose ocorrida no agregado alga-bactéria em sistema LAT sob batelada sequencial;
- c) Verificar o desempenho de diferentes metodologias de extração de lipídios da biomassa ao longo do período de monitoramento, tal que se avaliem os melhores resultados sob o tempo de estudo;
- d) Avaliar os ácidos graxos obtidos a partir das metodologias de extração e o desempenho do biodiesel produzido em termos de número de cetano e valor de iodo;
- e) Verificar parâmetros de sedimentabilidade da biomassa e clarificação do esgoto usado como meio de cultura.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Em razão da crescente taxa de urbanização, sobretudo em países em desenvolvimento, a geração de resíduos líquidos de caráter doméstico e industrial é uma das questões mais desafiadoras do século 21. A escassez de matérias-primas, fertilizantes e energia impulsiona pesquisas na área de saneamento ambiental a fim de baratear a remediação de efluentes e recuperar recursos. Apesar de tratamentos aeróbios e anaeróbios desempenharem papel fundamental no tratamento do esgoto doméstico ao redor do mundo, o atendimento às normas de lançamento ainda requer um aprimoramento nas técnicas mais usadas.

Uma das alternativas mais promissoras são as microalgas - seres capazes de remover grandes quantidades de nutrientes e acumular moléculas de alto valor agregado e potencial energético. Porém, existe um leque de possibilidades ainda a ser explorado, o que inclui formas de cultivo, espécies empregadas, reatores, meios de cultura, colheita entre muitos outros. Um estudo aprofundado do tratamento do esgoto e das especificidades das microalgas é indispensável para a otimização dessa tecnologia de biorremediação e prospecção de subprodutos energéticos.

3.1 SISTEMAS CLÁSSICOS DE TRATAMENTO

O efluente doméstico é produto do descarte líquido de residências e estabelecimentos comerciais. Apresenta DBO em torno de 47,0 - 466,0 mgO₂.L⁻¹, pH 6,3 - 8,1, nitrogênio total 1,7- 34,3 mg.L⁻¹ e fósforo total 0,11-22,8 mg.L⁻¹. Em corpos hídricos, a matéria orgânica é degradada por bactérias heterotróficas, reduzindo os níveis de oxigênio a zero. Os nutrientes agem como bioestimulantes, induzindo o crescimento descontrolado de produtores primários que, diante do esgotamento dos nutrientes, morrem em massa e liberam mais matéria orgânica. Além disso, patogênicos, medicamentos, surfactantes, metais pesados e outros compostos também agem para degradar a qualidade do corpo hídrico (Metcalf & Eddy, 2014).

Desde o início do século 20, aplicam-se diversos métodos de redução do potencial deletério dos esgotos ao meio ambiente. Processos aeróbios, em especial, mostram elevado desempenho em aplicações de nível doméstico e industrial. Processos anaeróbios, por sua vez, são baratos e mais fáceis de operar, se mostrando

ferramentas poderosas na remediação de problemas ambientais associados ao descarte de esgotos em condições menos exigentes.

3.1.1 Processos aeróbios – Lodo Ativado

Os processos aeróbios de tratamento do esgoto fazem uso do oxigênio gasoso como aceptor de elétrons na conversão de matéria orgânica a compostos simples e biomassa segundo a equação 1 (Show; Lee, 2017).



O método de tratamento de esgoto mais comum e que faz uso do metabolismo aeróbio é o processo de Lodos Ativados, desenvolvido por Edward Allen e William Locket no início do século passado. Sua configuração mais usual inclui dois tanques onde, no primeiro, ocorre a inserção de ar por difusão ou agitação mecânica. O objetivo é realizar o tratamento secundário do esgoto, removendo o máximo de matéria orgânica possível por meio da heterotrofia bacteriana (Bitton, 2011).

No segundo tanque, também chamado de clarificador ou sedimentador, o liquor misto passa por uma separação física. O esgoto tratado e decantado é direcionado para as próximas etapas do tratamento enquanto o lodo sedimentado divide-se para ser descartado do processo ou para retornar ao primeiro tanque e manter a concentração de micro-organismos ativos (Bitton, 2011).

A quantidade de bactérias ativas no reator é de suma importância no tratamento, de maneira que, diante das grandes proporções, o parâmetro escolhido para seu monitoramento são os Sólidos Suspensos no Liquor Misto (SSLM). Além disso, o retorno de lodo faz com que o tempo de detenção hidráulica seja muito maior que o de retenção de sólidos (Metcalf & Eddy, 2014).

A composição do Lodo Ativado varia desde células de bactérias de dimensões menores que 1 μm , até flocos de bactérias e outros micro-organismos aglomerados de 1000 μm . O oxigênio varia ao longo do floco, chegando a zero em seu interior e permitindo conversões anóxicas (ver seção 3.1.3.1). Os gêneros de bactérias mais comuns no Lodo ativado são as gram-negativas *Zooglea*, *Pseudomonas*,

Flavobacterium, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Comomonas*, *Acinetobacter* e *Bacillus sp.* e as gram-positivas *Corynebacterium* e *Brevibacterium* (Metcalf & Eddy, 2014).

Sabe-se que a formação de flocos se dá em função estresse nutricional e ao agruparem-se, as bactérias tendem a fazer um uso mais eficiente dos nutrientes. Esta floculação ocorre pela excreção do chamado EPS, sigla em inglês para material polimérico extracelular. São carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios etc., que preenchem o vazio entre as células e se ligam às cargas elétricas das paredes celulares das bactérias. É essencial que o tempo de retenção de sólidos seja maior que o TDH para promover o estresse indutor do EPS (Bitton, 2011).

Tem-se, portanto, um sistema capaz de tratar diferentes tipos de esgoto com eficiência. Porém, o custo da aeração ainda é um empecilho à sua utilização, o que estimula a substituição por processos anaeróbios (Mathew *et al.*, 2022). Além disso, a alta produção de lodo é um desafio ambiental. O descarte em aterros sanitários ou a biodigestão em reatores anaeróbios são possibilidades reais, mas que adicionam outra camada de complexidade ao processo (Guo *et al.*, 2013; Liu; Tay, 2001).

3.1.2 Processos anaeróbios – UASB

Um complexo conjunto de bactérias anaeróbias restritas e/ou facultativas é capaz de realizar o processo de conversão da matéria orgânica via rota anaeróbia. Resumidamente, considera-se que esse processo se dê em 4 passos, a saber: (i) hidrólise, onde macromoléculas como amido, proteínas e lipídios são convertidos a compostos mais simples por meio da ação de enzimas; (ii) acidogênese, em que esses produtos são convertidos a hidrogênio, $\text{CO}_{2(g)}$, acetato e outros ácidos graxos voláteis; (iii) Acetogênese, onde o leque de ácidos é convertido a acetato e (iv) metanogênese, em que a matéria orgânica será estabilizada com a consequente produção de $\text{CO}_{2(g)}$ e $\text{CH}_{4(g)}$ (Kato; Florencio, 2001; Show; Lee, 2017).

Dentre os métodos que se utilizam do metabolismo anaeróbio, destaca-se o Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo. Desenvolvido por meio de pesquisas na Holanda em meados da década de 70, se compõe de um reator tubular dividido em 4 zonas. No fundo, se localiza uma camada de lodo densa, com alta velocidade de sedimentação e responsável pela maioria das reações. Acima, uma camada de lodo coloidal e, em seguida, uma zona de anteparos permite a

sedimentação do lodo capturado pela produção de biogás. Ao fim, localiza-se uma zona de separação trifásica, permitindo a coleta do biogás (Kato; Florencio, 2001).

A concentração de biomassa dos reatores UASB é alta, permitindo bons desempenhos mesmo diante de altas cargas orgânicas, além de apresentar boa adaptabilidade aos países tropicais como o Brasil. Alguns autores situam a remoção de matéria orgânica pelo UASB entre 65 a 80% (Van Haandel; Lettinga, 1994), outros, entre 40 e 70% (Chernicharo *et al.*, 2015). Além disso, esse tipo de reator apresenta baixa remoção de nutrientes. Saliba e Von Sperling (2017) acompanharam durante 4 anos uma estação de esgoto doméstico composta por 6 reatores UASB, verificando remoções médias de 34,8 % de nitrogênio orgânico e 6,3 % de fósforo total.

Diante dessas debilidades, é possível realizar a complementação do tratamento em lagoas. Nesse caso, grandes áreas promovem o crescimento de organismos fotossintetizantes que consomem os nutrientes, enquanto processos aeróbios e anaeróbios removem a matéria orgânica residual (Campos, 1999; Kato; Florencio, 2001). A dificuldade de implementação em áreas urbanas desse tipo de pós-tratamento se deve ao espaço restrito encontrado nessas regiões (Khan *et al.*, 2011).

Outra possibilidade é o uso de processos aeróbios. No trabalho já mencionado de Saliba e Von Sperling (2017), as seis unidades de UASB se seguiam a um sistema de lodos ativados, aumentando de 58 para 83 % a remoção de matéria orgânica, significando uma eficiência global de 93%. Porém, processos que necessitem de inserção de oxigênio demandam capital de investimento, manutenção e operação incompatíveis com a realidade de países em desenvolvimento (Tufaner, 2020).

3.1.3 Outros processos de tratamento de esgoto

Nitrogênio e fósforo causam a proliferação de fotossintetizantes em corpos hídricos - a chamada eutrofização (Bhandari *et al.*, 2023). Adiante, são discutidos os métodos clássicos de remoção desses compostos em estações de tratamento.

3.1.3.1. Nitrificação e Desnitrificação

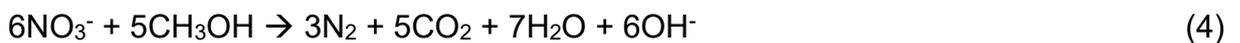
No Lodo ativado podem ser encontradas bactérias quimioautotróficas que usam oxigênio gasoso como aceptor de elétrons e nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) como

substratos. No primeiro caso, as bactérias nitrosomonas convertem nitrogênio amoniacal (NH_4^+) a nitrito, enquanto as nitrospiras convertem o nitrito a nitrato, conforme as equações 2 e 3 descritas abaixo (Metcalf & Eddy, 2014).



Esse processo, chamado nitrificação, é o primeiro passo da remoção de nitrogênio dos esgotos em sistemas de lodos ativados. Como as bactérias autotróficas necessitam de maiores períodos para se desenvolver, a idade do lodo frequentemente deve ser aumentada para viabilizar a nitrificação. Além disso, a nitrificação consome alcalinidade, parâmetro que deve ser fornecido por outros tratamentos (Bitton, 2011).

O nitrato também pode funcionar como aceptor de elétrons no metabolismo denominado anóxico. Nesse caso, a matéria orgânica servirá de substrato e o produto das reações metabólicas será o nitrogênio gasoso, como descrito na equação 4 a seguir, onde o metanol é oxidado. Essa conversão é chamada de desnitrificação e é o último passo na remoção de nitrogênio, frequentemente presente em sistemas de lodos ativados (Bitton, 2011; Metcalf & Eddy, 2014).



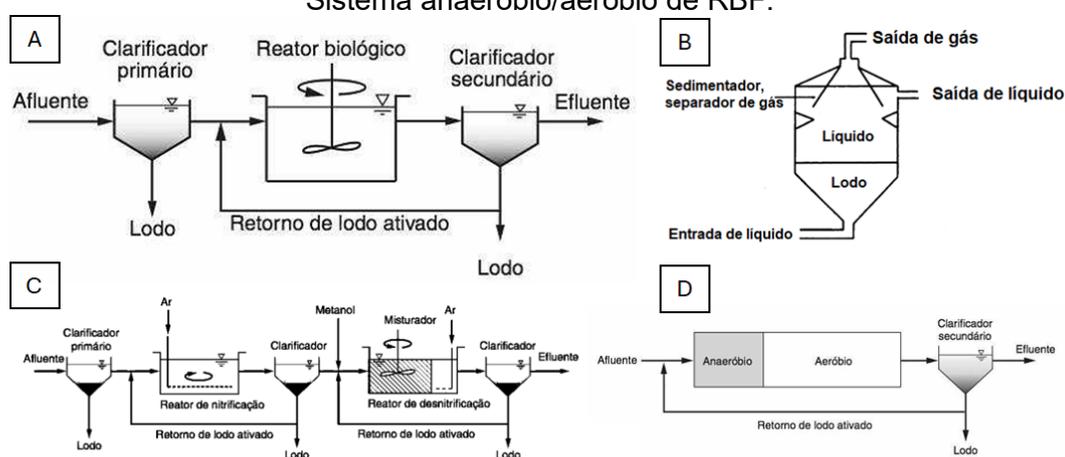
Como observado, é necessária a presença de matéria orgânica e, diante da escassez gerada pelo tratamento aeróbio secundário, algumas alternativas podem ser tomadas. Pode-se adicionar matéria orgânica facilmente biodegradável, tal como metanol ou acetato no reator de desnitrificação quando este se localiza após o tratamento aeróbio (Desnitrificação pós-anóxica). Também é possível tratar o efluente em um tanque de desnitrificação prévio ao lodo ativado, recebendo matéria orgânica facilmente biodegradável do esgoto bruto (pré-anóxica) (Metcalf & Eddy, 2014).

3.1.3.2. Remoção Biológica de Fósforo (RBF)

Lodos ativados também são ricos em bactérias do tipo PAO, sigla em inglês para organismos acumuladores de fosfato. São bactérias que, em um primeiro reator

anaeróbio, assimilam matéria orgânica rapidamente biodegradável (DBO_{rb}), principalmente ácidos graxos voláteis (AGV), como acético e propiônico, convertendo-os a polihidroxialcanoatos (PHA) e liberando reservas de polifosfato e glicogênio. Em um segundo reator aeróbio, as reservas de PHA são oxidadas e usadas no crescimento celular, o que gera uma assimilação superavitária quando comparada à liberação anterior. Assim, tem-se a chamada Remoção Biológica de Fósforo Assistida (RBFA) e a produção de um lodo rico em fósforo (Bitton, 2011; Metcalf & Eddy, 2014).

Figura 1 - Esquemas dos tratamentos de esgoto clássicos. Na ordem: Sistema aeróbrio (A), Reator anaeróbio de fluxo ascendente (B), Sistema se nitrificação/desnitrificação e (D) Sistema anaeróbio/aeróbio de RBF.



Fonte: Adaptado de Bitton (2011) e Metcalf e Eddy (2014).

No entanto, algumas peculiaridades dos processos de desnitrificação e RBF dificultam a remoção de ambos os nutrientes em uma mesma ETE. Em primeiro lugar, em razão do primeiro passo da remoção de nitrogênio depender de bactérias autotróficas, seu crescimento lento demanda maiores idades de lodo, o que reduz a compatibilidade com as PAO, que apresentarem metabolismos mais rápidos. Além disso, o descarte do lodo é fator fundamental na efetiva remoção de fósforo, reduzindo os valores aceitáveis de retenção de sólidos, fundamentais para a manutenção da etapa de nitrificação/desnitrificação (Metcalf & Eddy, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

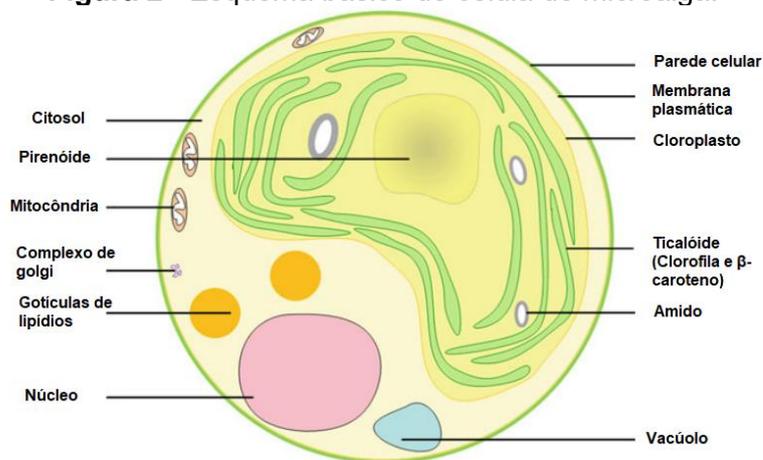
Tanto desnitrificação quanto a remoção biológica de fósforo necessitam de matéria orgânica rapidamente biodegradável (DBO_{rb}), parâmetro frequentemente limitado a valores em torno de 100 mg.L^{-1} em esgotos domésticos. Por fim, a recirculação de lodo dos tanques de nitrificação tem a tendência de prejudicar de forma significativa a RBF em razão da ação do nitrato sob a assimilação de fósforo

das PAO, sobretudo quando os valores de AGV são baixos (Bitton, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

3.2 MICROALGAS

A um vasto grupo polifilético de organismos unicelulares e fotossintetizantes dá-se o nome de microalgas. Apresentando linhagens altamente diversificadas, podem ser procarióticos, como as cianobactérias, ou eucarióticos, como as algas verdes (clorofíceas). São encontradas em todos os ecossistemas da terra, incluindo ambientes terrestres e o número de espécies pode chegar a mais de 50 mil (Barkia; Saari; Manning, 2019; Borowitzka, 2018; Mata; Martins; Caetano, 2010). Além disso, desempenham papel fundamental no sequestro do carbono, sobretudo nos oceanos e lagos, respondendo por 50% da assimilação desse elemento (Paul *et al.*, 2021).

Figura 2 - Esquema básico de célula de microalga.



Fonte: Adaptado de Chhandama *et al.* (2021).

Apesar da utilização da biomassa de microalgas para fins de nutrição remontar a séculos atrás, apenas nos últimos 140 anos esse grupo de micro-organismos passou a ser estudado mais atentamente (Borowitzka, 2018; Kselíková *et al.*, 2022).

3.2.1 Classificação das microalgas

A classificação das microalgas é complexa e representa um desafio para os especialistas. A mais aceita define oito filos, sendo sete pertencentes ao domínio

Eucariota (Euglenozoa, Cryptista, Haptophyta, Heterokontophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta) e um ao domínio Procariota (Cyanobacteria) (Levasseur; Perré; Pozzobon, 2020). Cada filo apresenta sua divisão e as classes mais abundantes são: Bacillariophyceae, ou Diatomáceas (Filo Heterokontophyta), Chlorophyceae e Trebouxiophyceae (filo Chlorophyta), Chrysophyceae, as algas douradas, e Cyanophyceae (Filo Cyanobacteria) (Borowitzka, 2018).

As cianobactérias são procariontes gram-negativos fotossintéticos e autotróficos. Caracterizam-se por uma estrutura celular simples, mas grande diversidade morfológica, apresentando filamentos, colônias, células individuais ou ainda filamentos coloniais agregados facilmente observados a olho nu. O principal representante é *Arthrospira platensis*, conhecida como Spirulina, microalga explorada comercialmente por sua biomassa rica em proteína e vitamina B12. Também pode ser mencionado o gênero *Microcystis*, que engloba várias espécies responsáveis por causar florescimentos e produzir as microcistinas, heptapeptídeos monocíclicos com alto poder de toxicidade a seres humanos (Borowitzka, 2018; Lee, 2018).

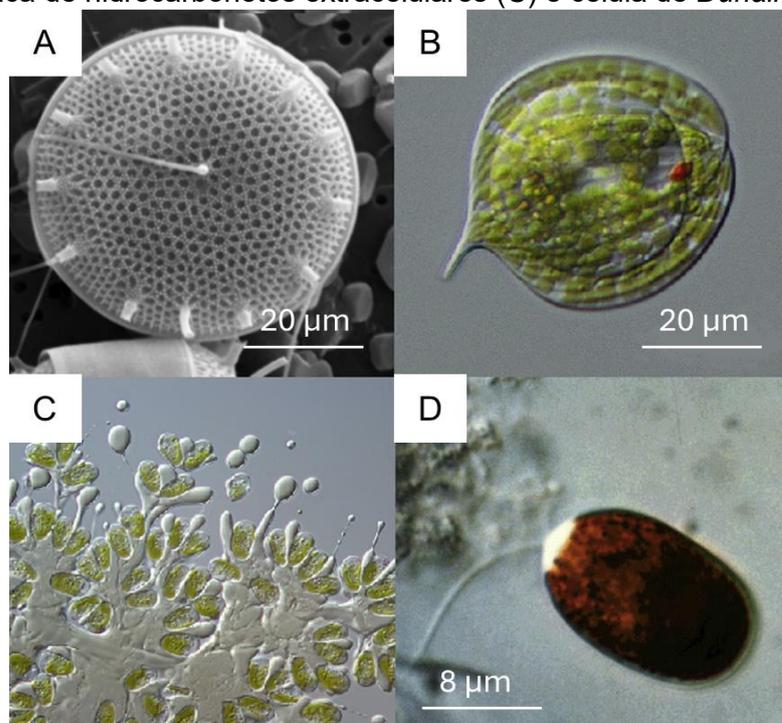
A classe Bacillariophyceae, conhecida como diatomáceas, são as microalgas mais ricas em número de espécies. Além disso, a grande maioria apresenta vida bentônica, se localizando presa ou deslizando sobre sedimentos. São claramente reconhecidas pela composição e aparência de suas paredes celulares em que o silício está presente em grande quantidade (Borowitzka, 2018; Lee, 2018).

O filo Chlorophyta inclui algas 90% de água doce e 10% marinhas, além de possuir a clorofila a e b como pigmentos fotossintéticos. Um integrante que ilustra os debates filogenéticos é o gênero *Desmodesmus* sp., que surge de uma separação de *Scenedesmus* sp. e inclui todas as espécies deste gênero que apresentam espículas, espinhos nas extremidades dos grupos de 2, 4, 8 e 16 células (An; Friedl; Hegewald, 1999; Gressler, 2011; Rosini; Sant'Anna; Tucci, 2013). Além disso, a classe varia conforme a fonte, estando ora incluído em Chlorophyceae, ora em Trebouxiophyceae (Borowitzka, 2018; Lee, 2018; Ruggiero *et al.*, 2015).

As classes Chlorophyceae e Trebouxiophyceae incluem uma grande variedade de gêneros de interesse biotecnológico. *Dunaliella* sp. é fonte de carotenóides por acumular β -caroteno como resposta a ambientes estressantes. *Dunaliella salina* cresce em meios hipertônicos ao acumular glicerol como regulador da pressão osmótica e é a principal fonte de β -caroteno natural do mundo (Borowitzka, 2018).

Chlorella sp., uma integrante de Trebouxiophyceae, foi o primeiro gênero de microalgas isolado no mundo, e é capaz de acumular até 50% do peso em proteínas durante fase exponencial de crescimento, tornando-se um importante suplemento alimentar humano e animal. *Botryococcus* sp. possui a notável capacidade de expelir uma matriz extracelular que envolve as colônias de células e é composta de carboidratos de até 34 carbonos, semelhantes a óleos de petróleo cru. O gênero é fonte de estudo visando a chamada “ordenha”, a extração não destrutiva de compostos energéticos por meio de solventes bio-compatíveis (Borowitzka, 2018).

Figura 3 - Exemplos de microalgas típicas, como a diatomácea cêntrica *Thalassiosira alleni* (A), a euglenóide *Phacus curvicauda* (B), células de *Botryococcus braunii* envoltas em matriz orgânica de hidrocarbonetos extracelulares (C) e célula de *Dunaliella salina* (D).



Fonte: Adaptado de Borowitzka (2018).

3.2.2 Biologia e metabolismo de microalgas

A principal rota metabólica de síntese celular das microalgas é a autotrófica, caracterizando-se pela assimilação da radiação fotossinteticamente ativa e conversão de $\text{CO}_2(\text{g})$ ou $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$ em matéria carbonácea, isto é, transformação da energia luminosa em química (Su, 2021; Xie *et al.*, 2022). Os elétrons armazenados na forma

de ATP são utilizados no ciclo de Calvin para a produção de açúcares. As equações 4, 5 e 6, a seguir, representam o processo simplificado em sequência.



Na célula de microalga, o nitrogênio é utilizado na síntese de proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos e outros. Microalgas eucarióticas tendem a preferir a assimilação desse nutriente na forma de NH_4^+ em razão do menor gasto energético quando comparado com a assimilação de NO_3^- . No primeiro caso, a ação das enzimas glutamina sintetase e glutamina oxoglutarase amidotransferase agem no nitrogênio amoniacal produzindo o glutamato, substância usada na produção de carboidratos e lipídios a posterior. Na rota de assimilação de nitrato, ainda é necessária a ação das enzimas nitrato e nitrito redutases a fim de produzir a molécula de NH_4^+ necessária ao processo de síntese de glutamato (Su, 2021).

O fósforo é um macronutriente essencial à síntese de ácidos nucleicos, ATP, fosfolipídios e outros. As formas preferenciais na assimilação por parte das microalgas são os fosfatos inorgânicos, a saber HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e PO_4^{3-} . Porém, polifosfatos também são assimiláveis. Transportados por enzimas até o citoplasma, as diversas formas de fósforo são convertidas a polifosfatos insolúveis nos vacúolos e proteínas, ácidos nucleicos, DNA e RNA nos cloroplastos (Su, 2021).

3.2.3 Metabolismo do carbono nas microalgas

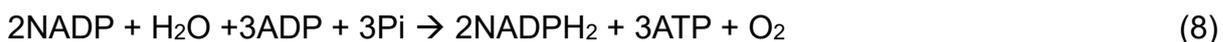
A produção de açúcares via fotossíntese é o principal processo de armazenamento energético presente nas microalgas. Por isso, o seu aprofundamento permite um melhor entendimento das dinâmicas ocorridas em sistemas algais.

3.2.3.1 Captura de carbono e energia

O cloroplasto é a principal organela envolvida na captação de energia nas microalgas e se compõe de sacos em formato de disco (tilacóides) envoltos em um

líquido (estroma). A conversão luz-dependente de CO₂ em carboidratos ocorre nas membranas dos tilacoides, sendo viabilizada por estruturas como antenas, fotossistemas I e II, citocroma b6/f e ATP sintetase. Os fotossistemas I e II são supercomplexos de pigmentos proteicos que absorvem a luz e iniciam a cadeia de transporte de elétrons a fim de reduzir o NADP⁺ a NADPH₂ (Daneshvar *et al.*, 2022).

A fotossíntese começa quando fótons absorvidos são dirigidos para os centros reacionais do fotossistema II. Um dímero da clorofila absorve energia no máximo comprimento de onda de 680 nm, sendo indicado por P680 e se foto-oxidando segundo a reação 7, e liberando elétrons, conseqüentemente. Os elétrons seguem complexas cadeias do sistema fotossintético até atingir o NADP⁺ e o ADP, que serão reduzidos segundo a equação 8 (Daneshvar *et al.*, 2022).



ATP e NADPH₂ são usados em reações não dependentes da luz no ciclo de Calvin-Benson que ocorre no estroma. O CO₂ é adicionado à ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), produzindo um composto instável que se separa em duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. Esse passo é chamado carboxilação e sua realização é dependente da atividade da enzima Ribulose 1,5-bifosfatato carboxilase/oxidase (RuBisCO). O ácido 3-fosfoglicérico é fosforilado pelo ATP, sendo em seguida transformado em gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) pelo NADPH₂. Boa parte do GA3P é convertido de volta à RuBP, enquanto outra parte é armazenada na forma de amido nos cloroplastos (Colman *et al.*, 2002; Daneshvar *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2017).

O CO₂ também pode ser incorporado em moléculas como proteínas, lipídios, ácidos orgânicos e outros, o que depende das condições de cultivo (luz, concentração de CO₂ e meio de cultura). Portanto, é razoavelmente conhecido que o produto primordial da fotossíntese são os carboidratos (Daneshvar *et al.*, 2022).

3.2.3.2 Mecanismo de concentração de carbono (MCC)

A dissolução de CO₂ forma H₂CO₃, que se dissolve em HCO₃⁻ e H⁺ (Kassim; Meng, 2017). Existem três formas de carbono inorgânico dissolvido (CID) na água:

dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}). Ambas existem em equilíbrio dependente do pH segundo as equações abaixo (Tran *et al.*, 2017),



A introdução do CO_2 reduz o pH e desloca o equilíbrio no sentido da presença maior de CO_2 e bicarbonato em desfavor dos níveis de CO_3^{2-} . Sob uma pressão parcial constante de CO_2 , se o pH for elevado, a quantidade de CID será aumentada, enquanto a proporção $\text{CO}_{2(\text{aq})}:\text{HCO}_3^-$ decresce. A forma mais disponível de CID é relevante para manter níveis aceitáveis de taxa de fotossíntese (Ihnken *et al.*, 2014).

A maioria das microalgas crescem bem em ambientes de pH entre 6,0 a 8,5, condições em que o carbono inorgânico se encontra na maior parte na forma de HCO_3^- , enquanto o CO_2 dissolvido atinge níveis menores que 1%. Além disso, a difusão do dióxido de carbono pode ser 10000 vezes menor na água que no ar. Há, portanto, uma limitação natural no suprimento de CO_2 (Colman *et al.*, 2002; Ihnken *et al.*, 2014).

A afinidade do CO_2 pela RuBisCO é relativamente baixa, além do gradiente de pH entre o citosol e o meio não favorecer o processo de difusão através da célula (Colman *et al.*, 2002). Em razão disso, produtores primários aquáticos como as microalgas desenvolvem o chamado mecanismo de concentração de carbono (MCC). Esse processo é capaz de aumentar os níveis de dióxido de carbono nos sítios da RuBisCO, suprimindo a função oxigenase e estabelecendo vantagens em condições de CO_2 inadequadas (Daneshvar *et al.*, 2022; Spalding, 2007; Zerveas *et al.*, 2021).

Essa aquisição de CO_2 pode se dar de 3 formas: um transporte ativo de HCO_3^- , transporte ativo de CO_2 e por atividade da enzima carbono anidrase (CA) no exterior da membrana plasmática. No primeiro, o bicarbonato é acumulado no citoplasma, onde passa por hidrólise por ação da CA, que converte HCO_3^- a CO_2 e hidroxila (Kassim; Meng, 2017). No transporte ativo de CO_2 , transportadores desconhecidos coletam o CO_2 circundante. Por fim, no processo restante a enzima carbono anidrase é excretada e atua elevando o nível de CO_2 , absorvido de forma ativa ou por difusão (Colman *et al.*, 2002; Daneshvar *et al.*, 2022; Spalding, 2007; Zerveas *et al.*, 2021).

Em resposta ao MCC, as concentrações de CO₂ no citosol podem aumentar em 180 vezes para microalgas eucarióticas e entre 800 e 900 vezes para cianobactérias (Singh; Sundaram; Kishor, 2014). Aspectos físico-químicos, nutricionais, propriedades dos gases adicionados e tipos dos reatores do cultivo de microalgas são capazes de afetar a eficiência do aporte de CID. Por exemplo, a adição de gases industriais com concentração de CO₂ acima de 10% frequentemente danifica os sítios da RuBisCO, inibindo o crescimento (Daneshvar *et al.*, 2022).

A preferência por formas assimiladas varia entre as espécies. Microalgas como *Scenedesmus obliquus*, *Clamdomonas reinhardtii* e *Chlorella pyrenoidosa* apresentam atividade da Carbono anidrase interna, o que as permite absorver tanto CO₂, quanto HCO₃⁻ (Ihnken *et al.*, 2014; Zerveas *et al.*, 2021). Outras, possuem MCC extremamente eficientes na captação de uma ou de outra forma (Daneshvar *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2017). Algumas espécies também exibem a capacidade de se aclimatar às formas de carbono inorgânico (Spalding, 2007).

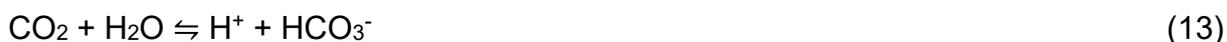
3.2.3.3 Alcalinização fotossintética

O termo alcalinidade é uma abstração utilizada como medida inversa da concentração de doadores fortes de prótons em uma solução (Tran *et al.*, 2017). Um efeito associado à captação de carbono por produtores primários é o aumento da alcalinidade do meio, fator observado em diversas microalgas, cianobactérias e mesmo cloroplastos de plantas superiores (Shiraiwa; Goyal; Tolbert, 1993). Nas microalgas, esse efeito já foi reportado pela absorção de CO₂, aumento da quantidade de carbonato, bicarbonato e hidroxila e decréscimo das concentrações de CO₂ durante a fotossíntese (Kassim; Meng, 2017).

O MCC permite às microalgas assimilarem CO₂ e HCO₃⁻, aumentando o pH por mecanismos diversos (Tran *et al.*, 2017). Em altos valores de pH, a forma predominante é bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃⁻) e a alcalinização se deve à conversão do HCO₃⁻ externo, por atividade da CA, em CO₂ e OH⁻, seguida de uma rápida absorção de CO₂. A reação ocorrida é a equação 12, muito observada em algas verdes unicelulares (Shiraiwa; Goyal; Tolbert, 1993).



Se tratando da alcalinização via absorção de CO₂, há que se notar que as equações 9 e 10 podem ser condensadas na seguinte reação:



Ao retirar um componente do lado esquerdo da reação, o transporte ativo ou difuso do CO₂ desloca o equilíbrio nessa direção, reduzindo as quantidades de prótons H⁺. Em um estudo recente, Zerveas *et al.* (2021) concluíram que é possível que o processo fotossintético também demande prótons H⁺, reduzindo o pH por sua retirada direta. Mudanças no pH durante o crescimento algal dependem do tipo de CID, luminosidade e assimilação. Porém, é razoavelmente conhecido que o pH aumenta à medida que CID é consumido durante a fotossíntese. Apesar da respiração noturna reduzir o pH, não é capaz contrabalancear o efeito (Tran *et al.*, 2017).

Os efeitos da alcalinização nos cultivos envolvem a elevação do pH que, por sua vez, prejudica crescimento das células. Além de gerar estresse oxidativo, danoso às células, o cultivo em pHs alcalinos dificulta o acesso ao CO₂, visto que em valores acima de 9,0, sua quantidade é quase insignificante (Kassim; Meng, 2017; Shiraiwa; Goyal; Tolbert, 1993).

Na natureza, o CID é reabastecido pela dissolução do carbono atmosférico, o que também é capaz de normalizar o pH após um longo tempo. Em sistemas algais de biorremediação, a alcalinização representa um desafio a ser transposto. Uma das estratégias mais comuns, é o suprimento gases do fluxo industrial que, por sua natureza, por vezes possui níveis tóxicos de CO₂, SO_x e NO_x (Daneshvar *et al.*, 2022).

3.2.4 Aplicações das microalgas

Como observado, por meio de um conjunto complexo de rotas metabólicas, macro e micronutrientes e carbono são convertidos em biomassa algal. Esta se caracteriza pela presença de uma variedade de carotenóides, proteínas, carboidratos, lipídios, enzimas e diversos outros compostos (Barkia; Saari; Manning, 2019). Na atualidade, é fonte crescente de estudos o barateamento e aprimoramento da chamada biorrefinaria algal, o processo integrado de conversão da biomassa de microalgas em subprodutos de baixo ou alto valor agregado (Chandra *et al.*, 2019).

3.2.4.1 Biorrefinaria algal

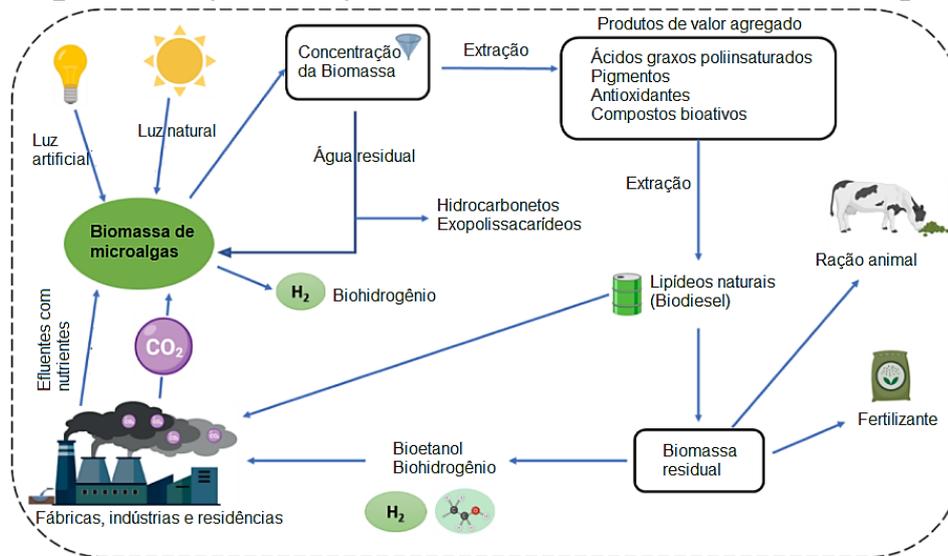
O conceito de biorrefinaria pode ser definido como a utilização integrada da biomassa renovável com enfoque energético e na produção de compostos demandados pelo mercado (Olguín *et al.*, 2022). Nesse sentido, a biomassa de microalga é uma matéria-prima com grande potencial de aplicação, ao ponto de serem conhecidas como “fábricas verdes”. De fato, são 3 a 10 vezes mais eficientes na realização da fotossíntese que as plantas superiores, produzindo uma série de metabólitos de alto valor energético e comercial (Olguín *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023).

Aponta-se que microalgas são capazes de fixar até 1,83 kg de CO_{2(g)} por quilo de biomassa produzida. A biomassa resultante pode ser rica em carboidratos, substâncias passíveis de serem digeridas em reatores anaeróbios, produzindo metano (CH_{4(g)}), hidrogênio gasoso (H_{2(g)}), sulfeto de hidrogênio (H_{2S(g)}) e compostos orgânicos voláteis. O biogás produzido pode ser purificado originando o metano puro ou uma mistura com o hidrogênio que melhora a eficiência e reduz a quantidade de subprodutos indesejáveis após a queima (Bhandari *et al.*, 2023).

Além disso, a fermentação alcóolica dos carboidratos algais produz o bioetanol de terceira geração, enquanto cepas de algas modificadas geneticamente podem ser induzidas a produzir um bioetanol de quarta geração (fotofermentação). A pirólise da biomassa a 800 – 1000 °C ainda resulta no gás de síntese, mistura de dióxido de carbono, hidrogênio, metano e outros gases que atua como insumo na produção de diversos subprodutos energéticos (Okeke *et al.*, 2022). O conteúdo lipídico das microalgas atua como insumo do biodiesel e será discutido na seção 3.6.

Espécies como *Arthrospira platensis*, também conhecida como Spirullina, e *Chlorella* sp. apresentam teores altos de proteínas, podendo ultrapassar 50% (Okeke *et al.*, 2022). Além disso, produzem vitaminas, compostos não sintetizados pelo corpo humano e precursores de cofatores de enzimas. Os produtos de alto valor agregado incluem também os carotenóides, como o β-caroteno, fitoesteróis, antibióticos, anticorpos monoclonais, substâncias hepatotóxicas e neurológicas, hormônios, enzimas, dentre outros (Okeke *et al.*, 2022; Olguín *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023).

Figura 4 - Esquema simplificado de biorrefinaria à base de microalgas.



Fonte: Adaptado de Okeke *et al.* (2022).

Vê-se que a biorrefinaria à base de microalgas possui um amplo espectro de possibilidades de produtos a serem extraídos. Porém, fatores como contaminação dos cultivos, consumo energético, alto investimento em maquinário, dificuldade de colheita e paredes celulares recalcitrantes dificultam a produção de biomassa algal em larga escala a custos competitivos com outras matérias-primas. Chandra *et al.* (2019) apontam que é imprescindível o barateamento dos custos dos meios de cultivo e diante disso, o uso de efluentes se mostra a alternativa mais viável à disposição.

3.2.4.2 Tratamento de efluentes domésticos

Em razão dos volumosos requisitos nutricionais, um meio de cultivo algal abundante e rico em compostos específicos é necessário. Estudos com meios de cultivo sintético, apesar do melhor controle da produtividade celular, esbarram na dificuldade financeira de prover nutrientes que se assemelham a fertilizantes utilizados na agricultura. Assim, o barateamento da biorrefinaria algal passa por uma etapa obrigatória de encontrar matérias-primas econômicas (Chandra *et al.*, 2019).

A mais promissora é o esgoto doméstico por sua abundância de substâncias como nitrogênio amoniacal (NH_4^+), fosfatos inorgânicos e micronutrientes, sendo um meio de cultivo extremamente atraente. De fato, em um estudo recente, Lee *et al.* (2022) isolaram cepas de microalgas em esgotos domésticos e agrícolas de maneira

a obter as mais eficientes no tratamento dos esgotos em reatores tubulares aerados. A espécie *Chlorella sorokiniana* JD1-1 removeu 89,2% do nitrogênio total e mais de 99% do fósforo total, apresentando também uma depleção mais acelerada quando comparada com o meio de cultivo BG-11.

Em outro estudo laboratorial, Silambarasan *et al.* (2021) implementaram o cultivo simultâneo dos gêneros de algas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* em esgoto doméstico diluído a uma concentração de 75%, obtendo alta concentração de biomassa (1,78 g.L⁻¹) e conteúdo lipídico (34,83% no peso seco). Além disso, o consórcio removeu 98% de N-NH₄⁺, 83% de DQO e 95% de fósforo total.

Sistemas mistos, isto é, sem o controle de espécies, também não carecem de resultados promissores. Dos Santos Neto *et al.* (2021) operou lagoas de alta taxa em escala de bancada alimentadas com efluente doméstico e encontrou remoções de nitrogênio amoniacal de 83 ± 9% na fase de estabilidade do sistema. Além disso, Sátiro (2021) promoveu o crescimento de microalgas em lagoas de alta taxa em escala piloto com e sem adição de lodos ativados, obtendo remoções acima de 88% e 77% para nitrogênio amoniacal e nitrogênio total, respectivamente.

Além do meio nutricional, o método de cultivo assume importância significativa na produção algal, tornando seu estudo a fundo uma atividade necessária para a otimização da biorrefinaria.

3.3 MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas de maneira otimizado deve levar em conta uma série de fatores, como a espécies desejadas, forma de aplicação de luz e CO₂, além do meio de cultura empreendido. Tendo isso em mente, uma série métodos de produção de microalgas foram desenvolvidos ao longo da história dos estudos na área, cada qual satisfazendo necessidades locais e econômicas.

3.3.1 Sistemas fechados

Os sistemas de cultivo algal do tipo fechado fazem uso do isolamento físico entre o ambiente e a cultura. Esses sistemas são chamados de fotobiorreatores, e se caracterizam pela flexibilidade, alta produtividade e controle confiável de temperatura,

pH, OD e espécies desenvolvidas (Paul *et al.*, 2021). As condições internas e externas podem ser otimizadas a fim de suprir as necessidades biológicas e físicas das espécies cultivadas, podendo entregar produtividades tão altas quanto 0,63 a 0,74 g.L⁻¹.d⁻¹ (Tan *et al.*, 2014; Yang; Ding; Zhang, 2008). Poeira e contaminantes não são inseridos, o que facilita a produção centrada em um tipo de espécie de microalga, otimizando a extração de bioderivados e energia (Paul *et al.*, 2021).

Em geral, cultivos fechados podem ser divididos em três tipos: tubo vertical, placas e tubo horizontal. Os tubos verticais são fotobiorreatores em que a altura costuma ser entre 2 e 10 vezes a largura. A inserção de CO_{2(g)} costuma ser facilitada e feita por um difusor na parte inferior, além de ser o fator primordial considerado na construção. Tal qual qualquer reator fechado, o acúmulo de oxigênio pode vir a prejudicar a produção, visto que altas concentrações afetam negativamente a produção. A relação área/volume é alta, o que facilita a iluminação (Chew *et al.*, 2018).

Nos fotobiorreatores de placas, o cultivo flui em cascata por entre duas placas e CO₂ é injetado em difusores. Apesar da alta relação área/volume e ótima penetração de luz, sofre com bioincrustação e estresse hidrodinâmico, que pode danificar as células (Ananthi *et al.*, 2021; Chew *et al.*, 2018). Por fim, os reatores de tubos horizontais são grandes tubos com diâmetros de 60 a 100 mm e grandes relações área/volume. Ótimas misturas radiais são alcançadas, porém pode haver acúmulo de oxigênio e a ampliação da escala é bastante difícil (Ting *et al.*, 2017).

De uma maneira geral, reatores fechados tendem a ser mais caros em sua construção, operação e manutenção. Ao custo de operar em escalas menores, é possível obter uma biomassa algal de caráter mais puro. Atualmente, espécies como *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis* são cultivadas em larga escala para a suplementação humana (Paul *et al.*, 2021; Ting *et al.*, 2017).

3.3.2 Sistemas abertos

Sistemas abertos de cultivo algal são os mais antigos e simples em operação por não colocar barreira física entre o cultivo e o ambiente. Em razão da configuração, o controle do valor de pH, temperatura e OD é difícil, enquanto a pureza do cultivo beira o impossível, a depender das escalas trabalhadas. O ganho se dá com o baixo custo de investimento e operação, além da tecnologia envolvida estar facilmente à

disposição (Paul *et al.*, 2021). Podem ser de três tipos: Lagoa simples, lagoa circular e lagoas de pistas, também conhecidas como lagoas de alta taxa (LAT).

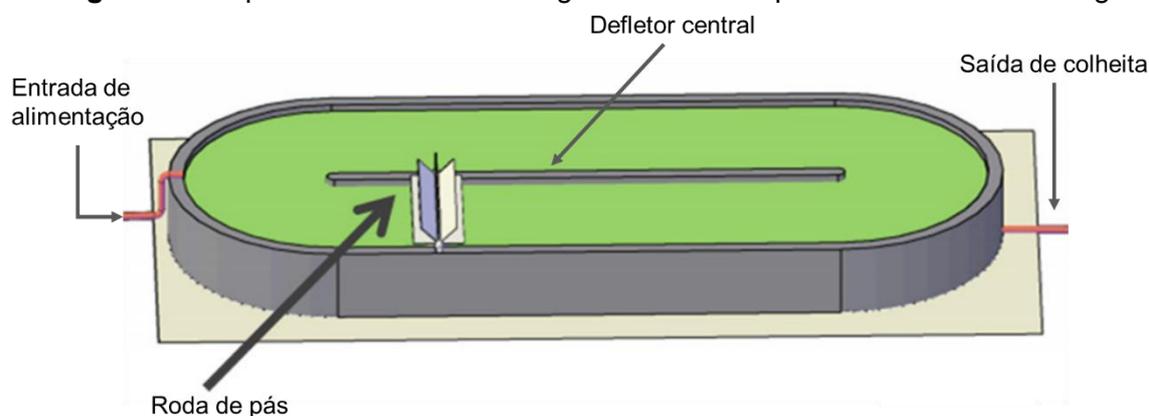
Lagoas simples são sistemas abertos e, geralmente, escavados no chão a uma profundidade máxima de 50 cm, onde o meio de cultivo é colocado e as células se desenvolvem sem quase nenhum controle. A agitação é praticamente impossível em escalas maiores e a eficiência de penetração de luz dependerá da área disponível. A vantagem desses sistemas é o baixo custo de investimento. Porém, sua produtividade é a mais baixa possível, em torno de 8,5 a 21 g.m⁻².d⁻¹ (Xiaogang *et al.*, 2022).

Lagoas circulares são sistemas de cultivo bastante populares nos países asiáticos para a produção de *Chlorella vulgaris* visando a alimentação humana. São lagoas circulares de 0,2 a 0,3 m de profundidade e 0,4 a 0,5 m de diâmetro. Possuem um agitador central, o que evita o autossombreamento, e são mais eficientes que lagoas comuns, embora ainda sujeitas à contaminação (Suparmaniam *et al.*, 2019).

3.3.3 Lagoas de alta taxa (LAT)

Lagoas de pista, ou lagoas de altas taxas (LAT), são métodos de cultivo desenvolvidos na década de 50 por Oswald e colaboradores com o objetivo de maximizar a produção algal e o consumo da matéria orgânica (Lizzul; Allen, 2017). Como mostrado na Figura 5, é um sistema de canaleta e inclui um ou mais difusores centrais e uma hélice motorizada para a agitação. Podem ser feitas de concreto ou plástico e pode haver a injeção de CO_{2(g)} a fim de evitar a limitação de carbono (Young; Taylor; Fallowfield, 2017).

Figura 5 - Esquema básico de uma lagoa de alta taxa para o cultivo de microalgas.



Fonte: Vassalle *et al.* (2020).

Estudos variam quanto à produtividade das LAT, alguns apontando 0,18 a 0,25 g.L⁻¹.dia⁻¹ (Lizzul; Allen, 2017), outros girando em torno de 0,29 a 0,36 g.L⁻¹.dia⁻¹ (Sutherland *et al.*, 2015). É consenso que o meio de cultura mais economicamente viável para o cultivo de microalgas em LAT é o esgoto, sobretudo o de natureza doméstica, o que pode vir a influenciar a qualidade da biomassa e os subprodutos. Esse tipo de cultivo destina-se, principalmente à produção de bioenergia e ração animal, mas a empresa *Cyanotech* produz Astaxantina em LAT cultivando *Haematococcus pluvialis* (Lizzul; Allen, 2017).

Lagoas de Alta taxa atraem grande atenção em razão dos baixos custos de investimento e operação necessários (~ R\$ 106,74/m²) e baixo consumo de energia (0,12 – 1 W.m⁻³_{reator}), tornando-se competitivas para comunidades de baixo e médio porte (Alcántara *et al.*, 2015). Segundo Lizzul e Allen (2017), a produção de bioenergia à partir da biomassa algal só pode ser viabilizada com a ampla implantação das LAT como sistema de cultivo em função de suas vantagens. A compreensão dos fatores físicos, químicos e biológicos é fundamental para sua a previsibilidade e otimização.

3.3.3.1 Parâmetros químicos

O principal fator químico que influencia o crescimento e tratamento em LAT é o pH e, como qualquer sistema algal, pode sofrer com a elevação fotossintética, chegando a 11 em dias ensolarados. Como já discutido, nesse patamar a taxa de fotossíntese decai e o metabolismo das bactérias sofre séria inibição. Além disso, as formas HCO₃⁻ e CO₃²⁻ são favorecidas em detrimento do CO_{2(g)}, preferência das algas. Reduz-se a taxa de crescimento e o consumo de nutrientes não atinge o seu máximo possível. De maneira geral, valores próximos de 7,8 são adequados à maioria das microalgas de água doce em LATs (Sutherland *et al.*, 2015; Uggetti *et al.*, 2018).

A estratégia de controle do pH mais comum é a adição de CO_{2(g)}, seja puro ou misturado ao ar. A adição de gases de chaminés de indústrias tem sido estudada com afinco afim de atrelar o tratamento de esgoto e produção algal à melhoria direta da qualidade do ar. No entanto, a diluição necessária para a aplicação nas lagoas por vezes tem ficado na casa de 1%, tornando o processo impeditivo financeiramente. Além disso, o transporte de gases e a purificação para retirada de contaminantes tóxicos são bastante custosos (Su, 2021; Sun *et al.*, 2023; Uggetti *et al.*, 2018).

Com respeito à composição do meio, o esgoto doméstico fornece quantidades adequadas de nitrogênio e fósforo, mas pode ser pobre em matéria orgânica. Além disso, a razão N/P é capaz de limitar o crescimento em valores acima de 30 ou abaixo de 10. O carbono é fator limitante comum por se encontrar na razão C/N de 6:1 na biomassa algal e 3:1 no esgoto, sendo um sinal dessa limitação os altos valores de pH diurnos cujos malefícios ao cultivo já foram discutidos (Sutherland *et al.*, 2015).

3.3.3.2 Parâmetros físicos

Por se tratar de um sistema aberto, a penetração de luz na Lagoa de alta taxa é o parâmetro de maior importância para a produção da biomassa. A altura da lâmina d'água, portanto, desempenha um papel crítico de equilibrar o volume de tratamento e maximizar o acesso à radiação ao maior número possível de micro-organismos ativos (Arashiro *et al.*, 2019). Além disso, o empilhamento de cloroplastos das células causa um declínio da irradiação. É o chamado autossombreamento na lagoa, que reduz a eficiência fotossintética por unidade de massa de pigmento e irá depender da quantidade de clorofila das células (Sutherland *et al.*, 2015).

Outro parâmetro físico de crucial importância é a temperatura, que, como em qualquer sistema biológico, desempenha papel seletor dos grupos de organismos, além de influenciar na solubilidade dos gases O₂ e CO₂. LAT são sistemas conhecidos por operar bem em altas temperaturas. Porém, a variabilidade das espécies endógenas associada a variações climáticas aumenta a incerteza atrelada à produção de uma biomassa previsível (Ho; Goethals, 2020; Sutherland *et al.*, 2015).

Em um acompanhamento nas 4 estações do ano na Coréia do Sul, Cho *et al.* (2015) verificaram que o aumento da temperatura teve ação direta na produtividade algal, variando de 0,250 g L⁻¹ d⁻¹ no verão até 0,029 g L⁻¹ d⁻¹.

3.3.3.3 Parâmetros biológicos

O fator biológico de maior importância e intrínseco ao cultivo de lagoas é a presença virtualmente constante micro-organismos contaminantes. Água da chuva, vento e o próprio influxo do efluente afetado pela sazonalidade e origem, geram um perfil misto cujo controle de espécies ainda é uma incógnita na literatura. A inoculação

de espécies, manutenção do TDH, níveis de carbono e a recirculação da biomassa são estratégias estudadas, porém ineficientes, para a delimitação desejada (Park; Craggs; Shilton, 2011; Renuka *et al.*, 2016; Young; Taylor; Fallowfield, 2017).

Além disso, a fauna aquática plantônica também é responsável por influenciar a biomassa final nas lagoas de alta taxa. Nesses ambientes, os zooplânctons mais comuns são os rotíferos, cladóceros, copépodes e ostracodes. Destes, Cladóceros e rotíferos se sobressaem como os herbívoros mais impactantes na operação de LAT. Por meio do chamado “pastoreio”, esses seres reduzem drasticamente as quantidades de biomassa em menos de uma semana. Entretanto, técnicas de pastoreio seletivo podem ser aplicadas para a manutenção de uma cultura de zooplâncton que consuma microalgas menores, favorecendo a sedimentação mais eficiente (Montemezzani *et al.*, 2015; Montemezzani; Van Wagenberg; Craggs, 2023).

3.3.4 Tipos de regimes de operação

Cultivos algais podem ser operados de 3 maneiras mais comuns: em batelada, semi-contínuo ou contínuo. A literatura apresenta vasta quantidade de dados acerca do cultivo em batelada, em que as células recebem aporte de nutriente e são deixadas para crescer sem alimentação adicional até a etapa de colheita. Trata-se de uma tecnologia madura, utilizada para espécies como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Nannochloropsis salina* e *Cyclotella* sp. (Zhu, 2015).

Entretanto, níveis de irradiação e nutrientes não são constantes nesse tipo de operação em razão do crescimento das células. Enquanto os nutrientes se esgotam, o autossombreamento no reator aumenta, represando o desenvolvimento. Em razão disso, sistemas em batelada não são capazes de oferecer uma produção adequada de biomassa, embora estejam associados à bons rendimentos de subprodutos energéticos e uma maior flexibilidade (Ho *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2018).

Nos sistemas contínuos e semi-contínuos, o cultivo é submetido a uma primeira fase de batelada a fim de desenvolver um nível adequado de matéria orgânica biologicamente ativa. No sistema contínuo, uma parcela do liquor misto é retirada constantemente com igual adição de meio fresco (Zhu, 2015). As taxas de efluente e afluente são mantidas quando a fase estacionária é atingida e o desenvolvimento de novas células fica igual à taxa de morte celular (Ho *et al.*, 2014).

Entretanto, a baixa produtividade no patamar estacionário e a possibilidade de contaminação tornam a operação contínua menos preterida em escala industrial. Além disso, o cultivo ao ar livre sofre com a lavagem noturna da biomassa pelo crescimento lento (Ho *et al.*, 2014). Sua principal vantagem reside na facilidade do controle de nutrientes e pH e o fato de serem sistemas baratos (Ho *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2018).

No sistema semicontínuo, também chamado batelada sequencial (BS), uma porcentagem do cultivo no reator é retirada a cada ciclo de operação, sendo substituída por meio nutriente, enquanto parcela do cultivo anterior serve de inóculo do processo seguinte. Nesse tipo de operação, portanto, é possível manter um inóculo de qualidade em constante fase exponencial, de maneira a garantir altas taxas de crescimento específicas no reator (Tan *et al.*, 2018).

A operação em batelada sequencial é um processo mais praticável, simples e efetivo que o cultivo em batelada para a produção de bioenergia. São atenuados os problemas de autossombreamento e baixas taxas de crescimento. Esse regime mostra ser capaz de operar a longo prazo, podendo ser renovado por vários ciclos, enquanto a retirada da fase lag resultará em altas produtividades (Tan *et al.*, 2018).

Outra vantagem da operação do reator de microalgas em regime de BS é o curto tempo necessário para o estabelecimento de um pH elevado nas lagoas, o que facilita a remoção dos nutrientes, através da precipitação do fosfato e volatilização da amônia. Se o objetivo for o tratamento do esgoto, haverá uma redução significativa no TDH necessário e uma diminuição na demanda por área (Albuquerque, 2021).

Em diversos estudos, tanto o sistema contínuo quanto o semi-contínuo demonstram superioridade frente ao sistema de batelada em quesito de remoção de nutrientes, taxas de crescimento e produção de bioenergia. Por exemplo, Benvenuti *et al.* (2016) compararam o regime semi-contínuo e batelada em termos de produtividade de triacilgliceróis em reatores tubulares horizontais cultivando *Nannochloropsis* sp. CCAP 211/78. Embora tenham sido observados menores teores de lipídios no regime semi-contínuo quando comparado ao de batelada (22% contra 35%), houve um ganho em produtividade de biomassa no primeiro tipo de operação.

Além disso, no mesmo estudo de Benvenuti *et al.* (2016) os sistemas piloto sofreram menos estresse quando operados em fluxo semi-contínuo em razão da maior disponibilidade de nitrogênio com relação à luz disponível. Os autores propõem que a operação em fluxo semi-contínuo poderia tornar a produção de lipídios barata,

embora necessite de mais otimização em escala piloto e real. Por exemplo, no estudo houve a adição de CO₂ para controle do pH, atividade por demais onerosa.

He, Yang e Hu (2016) testaram em LATs, sob fluxo semi-contínuo e contínuo, 5 cepas de microalgas oleaginosas. Menores preços de produção para as espécies foram encontrados quando aplicadas no regime semi-contínuo. Mhedhbi *et al.* (2020) cultivaram, em batelada sequencial, um consórcio algal-bacteriano a partir de *Nanochloropsis gaditana*, obtendo remoções de 78% para NTK e 53% para DQO a partir de esgoto rico em N-NH₄⁺ e matéria orgânica. Além disso, Van Den Hende *et al.* (2016) demonstraram que o efluente de uma indústria alimentícia poderia ser tratado em LAT com TDH de 2 dias sob batelada sequencial havendo tratamento prévio.

Dados sugerem que a operação em regime semi-contínuo é uma estratégia razoável para a produção de microalgas e acumulação de carboidratos e lipídios, importantes subprodutos de caráter nutricional e energético. Entretanto, em raras vezes foram reportados estudos em escalas piloto e real, submetidas às intempéries do clima. Ho *et al.* (2014) sugerem que o uso de processos semi-contínuos para a produção de biodiesel de microalgas deve passar por mais estudos para a comprovação da sua viabilidade.

3.4 AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA

O tratamento do efluente e a recuperação da biomassa, com seus produtos de valor agregado, só se concretizam após a separação entre o lodo formado e o líquido tratado. Embora seja capaz de remover nutrientes eficientemente, as células algais possuem colheita dificultosa. É pensando nisso, que o cultivo simbiótico com bactérias a partir de lodo ativado foi proposto a fim de formar uma biomassa rica em material mucilaginoso, que sedimenta mais facilmente na forma de um floco chamado “agregado microalga-bactéria”, ou simplesmente “AMAB” (Ummalyima *et al.*, 2017).

3.4.1 Desvantagens dos sistemas algais

A etapa de colheita da algal em tratamentos de esgoto produz a biomassa rica nos inúmeros derivados já discutidos (González *et al.*, 2021). Entretanto, as células de microalgas apresentam grupos orgânicos de cargas negativas na parede celular,

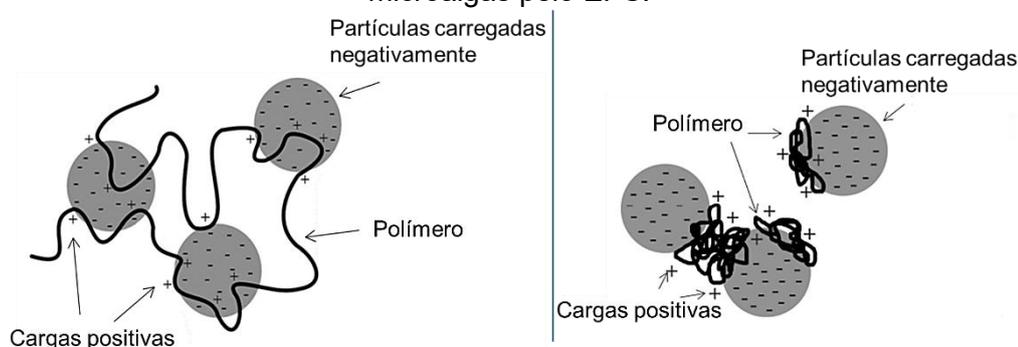
como aminas e ácidos carboxílicos. Esses grupos formam uma camada iônica, a camada elétrica dupla, cuja espessura é medida pelo potencial zeta, em mV. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta, maior a repulsão entre as células e mais difícil é a densificação da biomassa. (Li *et al.*, 2022; Park; Craggs; Shilton, 2011).

A fim de superar essas dificuldades, diversos são os métodos propostos para colher a biomassa algal. Um deles, a centrifugação, é eficaz ao custo de altas quantidades de energia. A coagulação com compostos inorgânicos como alumínio e cloreto férrico gera uma biomassa potencialmente contaminada. (Li *et al.*, 2022) A flotação é um processo promissor, mas inviável em grande escala. Em razão disso, a literatura estima uma parcela atual de 30 a 50% no valor final da biomassa referente à colheita (Mata; Martins; Caetano, 2010). A viabilização da biorrefinaria algal necessita, invariavelmente, de técnicas mais eficientes. (Li *et al.*, 2022).

3.4.2 Autofloculação e biofloculação

Duas das técnicas mais estudadas e ecologicamente promissoras para a colheita de microalgas são a autofloculação e biofloculação. Ambas se baseiam na dispersão das cargas elétricas das células algais por meio dos polímeros catiônicos conhecidos como EPS. Sua ação reduz o valor absoluto do potencial zeta tal que as forças de van der Waals excedem as repulsões eletrostáticas, causando a coagulação da biomassa (Jimoh; Keshinro; Cowan, 2019; Li *et al.*, 2022).

Figura 6 - Mecanismos ponte (A) e preenchimento (B) para a captura das células de microalgas pelo EPS.



Fonte: Adaptado de Babiak e Krzemińska (2021).

De maneira geral, a produção de EPS das microalgas é baixa, assumindo relevância em casos de pH alcalinos (>9,0), quando as células excretam polímeros

como forma de defesa ao ambiente estressante. A autofloculação, como é conhecida, é a sedimentação da biomassa por ação natural e algumas espécies apresentam tal capacidade, podendo ser usadas tanto isoladamente quanto em conjunto com outras algas de interesse comercial (Ummalyma *et al.*, 2017; Xiao; Zheng, 2016). Exemplo disso é o conjunto das microalgas *Ettilia texensis*, capaz de autoflocular (-18,9 a -12,1 mV), e *Chlorella vulgaris*, incapaz de flocular (-38,4 mV) (Salim *et al.*).

Visando sanar as baixas produções de EPS pelas microalgas, nos últimos anos tem sido proposta a biofloculação, coagulação da biomassa por meio da ação conjunta com outros micro-organismos como fungos e bactérias. Além dos grupos funcionais externos às células serem diferentes e levarem a um balanceamento do potencial zeta, certos tipos de micro-organismos são ricos na produção de EPS. Em especial, o uso de lodos ativados leva à formação de consórcio conhecido como agregados microalga-bactérias (AMABs) (Babiak; Krzemińska, 2021; Zhang *et al.*, 2020).

3.4.3 Biologia e metabolismo dos AMAB

Os agregados microalga-bactéria representam um tipo diferenciado de sobrevivência quando comparado com as formas planctônicas. As variáveis que desencadeiam sua formação ainda não são satisfatoriamente conhecidas, mas sabe-se que fatores bióticos e abióticos desempenham papel considerável (Jimoh; Keshinro; Cowan, 2019). O EPS que age como suporte dessa estrutura é rico em polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, substâncias húmicas, ácido urônico e outros. Essa matriz polimérica pode também atuar protegendo as células contra substâncias tóxicas e metais pesados por adsorção (Ummalyma *et al.*, 2017).

Os AMAB se compõem na maior parte de microalgas, bactéria e parcelas menores de células mortas, protozoários, rotíferos, ciliados, precipitados e íons quelados. São estruturas porosas, compressíveis e irregulares, variando de 100 a 5000 µm. Em LAT, a movimentação da roda de pás favorece a mistura e a captura das células na matriz gelatinosa (Jimoh; Keshinro; Cowan, 2019; Keshinro *et al.*, 2024)

A principal força motriz na manutenção do agregado alga-bactéria é a troca mutualística de gases entre fotossintetizantes e heterotróficos. O oxigênio produzido pelas microalgas é capaz de superar a saturação da água, sendo uma maneira eficiente de aeração. As bactérias produzem CO₂ durante a quebra de compostos

reduzidos para a obtenção de energia. O CO₂, por sua vez, é utilizado na fotossíntese, facilitando a estabilidade do sistema (Zhang *et al.*, 2020).

Além disso, outros compostos também são trocados, como vitaminas, quelantes e fitormônios. A saturação de oxigênio, fator que inibe a fotossíntese, é evitada, aumentando a eficiência do sistema. Estruturalmente, a matriz gelatinosa porosa de EPS facilita a permeabilidade dos gases, aproxima os organismos ativos e atua como uma barreira entre os micro-organismos e compostos externos com atividade inibidora, tóxica ou antibiótica (Babiak; Krzemińska, 2021).

3.5 APLICAÇÕES DE AGREGADOS MICROALGA-BACTÉRIA NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Como já mencionado, as estações clássicas de tratamento de esgoto necessitam do emprego de consumo heterotrófico da matéria orgânica, nitrificação, desnitrificação e remoção avançada de fósforo (Metcalf & Eddy, 2014). Por vezes, a utilização simultânea gera incompatibilidades e custos elevados. Tecnologias mais econômicas são objeto de pesquisa constante ao redor do mundo (Zhang *et al.*, 2017).

A biomassa de AMAB traz as propriedades de alto consumo de nutrientes e produção de O₂ e biocompostos das microalgas, e o consumo de matéria orgânica e produção de EPS e CO₂ das bactérias. Atrelado a isso, a sedimentação de flocos AMAB é espontânea e ocorre a taxas de 8,3 m/h, gerando uma biomassa 20 a 100 vezes mais concentrada (Jimoh; Keshinro; Cowan, 2019). Portanto, os AMAB são candidatos ao posto de tratamento de esgoto aplicável em larga escala.

Sabe-se que as taxas de remoção de nutriente estão associadas às taxas de crescimento e a literatura já conhece uma grande variedade de meios pelos quais o desenvolvimento algal é beneficiado pelo bacteriano em simultâneo. Exemplos são as vitaminas e fitohormônios, como auxinas, que aceleram o crescimento algal (Fallahi *et al.*, 2021). A fotossíntese promovida pelas microalgas no consórcio AMAB é capaz de oferecer 74% do suprimento de oxigênio necessário ao metabolismo das bactérias heterotróficas, enquanto a agitação forneceria o restante (Wang *et al.*, 2016).

A eliminação de amônia observada nos consórcios algal-bacterianos pode se dar de 3 maneiras: Assimilação na biomassa, nitrificação e volatilização (Fallahi *et al.*, 2021; Zhang; Li; Ho, 2021). Além disso Bankston, Wang e Higgins (2020) observaram

uma remoção de N-NH_4^+ 2 vezes maior em culturas algais em presença de lodo ativado. Sabe-se também que em quantidades baixas de amônia, a competição gerada tende a ser prejudicial às nitrificantes. De maneira controlada, essa competição pode levar a remoções de 100% de amônia (Fallahi *et al.*, 2021; Sepehri; Sarrafzadeh; Avateffazeli, 2020).

A remoção do nitrito/nitrato em consórcios AMAB está associada à assimilação e desnitrificação. Microalgas são capazes de assimilar nitrito e nitrato, mas não são nutrientes preferenciais e a remoção observada ocorre em menor velocidade quando comparada às bactérias (Su, 2021). Apesar do nitrato ser o aceptor de elétrons em condições anóxicas, o oxigênio fotossintético pode vir a prejudicar a desnitrificação em consórcios alga-bactérias (Bitton, 2011).

Diante disso, sabe-se que a remoção eficiente de nitrito e nitrato em sistemas AMAB representa um desafio a ser superado. Visto que a oxigenação do consórcio é reduzida em períodos de escuro, algumas pesquisas sugerem a operação em batelada sequencial para a indução de uma fase anóxica de desnitrificação (Chen *et al.*, 2019). Rezvani *et al.* (2018) demonstraram que microalgas mixotróficas poderiam ser utilizadas para a remoção de matéria orgânica durante períodos noturnos, reduzindo a quantidade de OD e favorecendo a ocorrência da desnitrificação.

A precipitação química e a assimilação são as principais rotas de remoção de fósforo na biomassa de AMAB (Zhang; Li; Ho, 2021). A interação entre os microorganismos pode vir a otimizar a assimilação, como observado no estudo de Higgins *et al.* (2018), em que vitaminas secretadas por bactérias agiram como cofatores do crescimento das microalgas associado à remoção de 100% de fósforo total.

O estudo de Rezvani, Sarrafzadeh e Oh (2020) também mostrou ganhos na remoção de fósforo em cultivos alga-bactéria ($6,34 \text{ mg.L}^{-1}$) quando comparados com cultivos algais ($4,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Os pesquisadores demonstraram que a assimilação é o processo de remoção mais significativo, superando a precipitação química. Além disso, outros estudos mostram que PAOs são capazes de estabelecer simbioses ao liberar fosfato diretamente assimilado pelas microalgas (Valverde-Pérez *et al.*, 2016).

Apesar de vários artigos indicarem razões de inóculo alga/bactéria que variam de 10:90, 5:1 e 1:1, foi provado em um artigo recente de Dos Santos Neto *et al.* (2021) que o inóculo de microalgas não se mostra necessário dentro de sistemas de lagoas

de alta taxa. Nesse caso, tem-se em mente a formação de flocos a partir de microalgas endógenas do esgoto e ambiente da estação.

O custo de tratamento de lagoas de alta taxa com agregados microalga-bactéria em escala piloto foi estimado em 0,25 a 0,5 euros.m⁻³, mostrando similaridade com tecnologias convencionais de tratamento. O custo de produção da biomassa vai variar de acordo com o meio de cultivo utilizado, ficando em torno de 5,26 a 8,07 Euros. kg⁻¹_{SST} segundo Vulsteke *et al.* (2017). Cabe mencionar que poucos estudos de custo da biomassa focam na realidade brasileira.

Na tabela 1 é apresentada uma compilação de estudos cujo foco se encontra na melhoria da eficiência do tratamento empreendido pela biomassa AMAB.

Tabela 1 - Estudos do uso de agregados microalga-bactéria no tratamento de efluentes.

Tipo do reator	Condições do agregado	Condições de operação	Desempenho do tratamento	Observações	Referência
Fotobiorreator em escala de bancada	Lodo alga-bactéria granular a partir de lodo ativado	Esgoto sintético sob recirculação e aeração intermitente	Remoção de carbono orgânico dissolvido, TN e TP: 40%, 60% e 15% (recirculação); 100%, 98% e 64% (aeração)	Lodo algal-bacteriano demonstrou melhor performance sob recirculação comparado à lodo bacteriano aeróbio	Ahmad <i>et al.</i> , 2019
Lagoas de alta taxa em escala de bacada (5,5 L)	Flocos alga-bactéria a partir de lodo ativado	Esgoto primário e secundário. Taxa de carregamento orgânico variável; TDHs de 5,5; 2,2 e 1,1 d. Operação por 130 dias.	Alta concentração de biomassa de 2,2 g.L ⁻¹ ; >99% de remoção de nutrientes e matéria orgânica. Biomassa sedimentável em 10 minutos	A análise cinética estimou a remoção completa dos nutrientes em aproximadamente 12 horas	Biliani; Manariotis, 2023
Reatores em batelada em escala de bancada	Consórcios <i>Chlorella vulgaris</i> - <i>Bacillus licheniformis</i> (CB) e <i>Microcystis aeruginosa</i> - <i>Bacillus licheniformis</i> (MB)	Diferentes razões alga/bactéria. Cultivo em Esgoto sintético	Remoção de sDQO, TDP e TDN: 86,55%; 80,28% e 88,95% (CB); 65,62%; 70,82% e 21,56% (MB)	Substâncias "quorum sensing" trocadas por <i>Chorella</i> e <i>Bacillus</i> induziram a uma melhor produção de EPS e tratamento do esgoto	Ji <i>et al.</i> , 2018
Lagoas de alta taxa em escala de bacada (21 L)	Consórcio algal (<i>Scenedesmus sp.</i> \cong 98%) e lodo ativado	Regimes de alimentação de 24, 12 e 0,1 h.d ⁻¹ . Esgoto real contendo surfactantes.	Maiores produções de biomassa (0,21-0,23 g.L ⁻¹) e remoção de nutrientes sob alimentação semi-contínua (TN: 74-76%; TP: 80-86%). Remoção de surfactantes acima de 90% em todos os regimes.	A alimentação em regime semi-contínuo mostrou vantagens frente à operação clássica contínua.	Serejo <i>et al.</i> , 2020

Lagoas de alta taxa em escala de bancada (31,26 L)	Consórcio alga-bactéria cultivado a partir dos esgotos em estudo	Razões C/N "ótimas" (=6), deficitárias (<6) e em excesso (>6) de carbono partir da mistura entre esgotos de abatedouros e cervejarias	Boa adaptação do consórcio às diferentes razões C/N. Maiores remoções de 62% (C/N ≥7,4), 59% (C/N = 4,1) 58% (C/N = 4,1)	Remoção de fósforo e nitrogênio foram mais efetivas em alto déficit de carbono. Alta disponibilidade de carbono gerou alta remoção dele.	Gama <i>et al.</i> , 2023
Lagoas de alta taxa em escala piloto (250 m ³)	Consórcio algal-bacteriano endógeno	Comparação entre agitação cessada por 10 dias e mantida continuamente	Agitação descontínua não afetou remoção de <i>Escherichia coli</i> e DBO5. Lagoa descontínua apresentou maiores níveis de NO ²⁻ e NO ³⁻ .	A performance de remoção não sofreu grandes alterações em razão da interrupção da agitação por 3 dias.	Butterworth; Fallowfield, 2024
Fotobiorreatores em escala de bancada (1 L)	<i>Scenedesmus</i> sp. e lodo aeróbio aclimatado à esgoto de celulose	Melhor razão alga/bactéria para o tratamento em esgoto de indústria de celulose	Melhores remoções: NH ₄ ⁺ : 86,81% (a/b 1:5); PO ₄ ³⁻ (a/b 3:1); Remoção de matéria orgânica e eficiência de floculação a 90%: a/b 5:1;	Em proporções mais ricas em algas, houve melhor remoção de fósforo. Em maior presença de bactérias, houve remoção mais eficiente de nitrogênio e matéria orgânica	Sátiro <i>et al.</i> , 2022
Sistema híbrido em escala de bancada de reator de biofilme e lagoa de alta taxa	Consórcio algal-bacteriano nativo desenvolvido em esgoto doméstico	Tratamento de esgoto doméstico com sistema híbrido de lagoa de alta taxa e reator de biofilme como concentrador de biomassa	Produtividade de biomassa 2,6x maior. Eficiência de colheita de 61% frente a 22% do sistema convencional. Aumento da diversidade de micro-organismos. Perfil lipídico e remoção de nutrientes de acordo com o tratamento convencional	Hibridização do sistema levou a ganhos elevados de colheita e produção, indicando grande potencial do tipo de sistema	Assis <i>et al.</i> , 2020

3.6 BIODIESEL ALGAL

Enquanto a demanda por energia aumenta incessantemente, as catástrofes climáticas associadas ao aquecimento global podem tornar-se 4 vezes mais frequentes se a elevação da temperatura global atingir 1,5 °C até 2050. Esse e outros cenários alarmantes só poderão ser atenuados caso as emissões de gases do efeito estufa sejam significativamente freadas (IPCC, 2023). Há décadas as microalgas são conhecidas fontes em potencial de bioenergia e sua aplicação em larga escala tem o potencial de auxiliar a humanidade na construção de um futuro ecologicamente correto (Mata; Martins; Caetano, 2010).

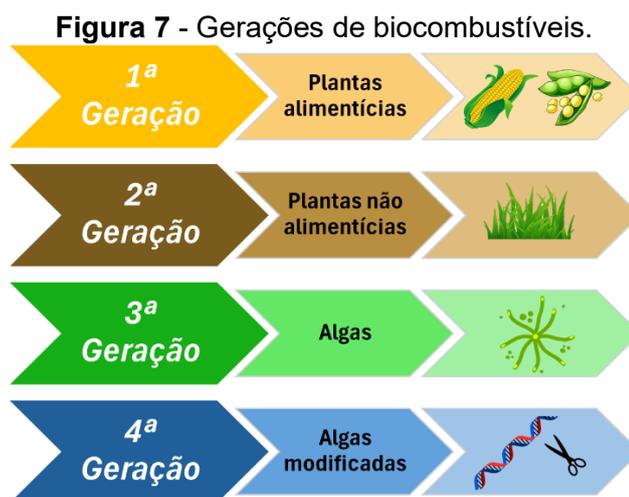
3.6.1 Crise energética, mudanças climáticas e biocombustíveis

Até 2016, 81% da energia global foi atendida por carvão, petróleo e gás natural enquanto o ano de 2021 viu um aumento de 5,8% na demanda energética primária. Porém, significativa exaustão desses combustíveis pode se dar nos próximos 50 anos. Além disso, o CO₂ emitido na queima em indústrias e veículos absorve radiação solar e impede a reflexão do calor do sol, de tal maneira que até o ano de 2023, já se observou um aumento de 1,1 °C na temperatura média global (Lv *et al.*, 2019).

O aquecimento global não poupa sinais: o nível de CO₂ é o maior dos últimos 2 milhões de anos; o aquecimento dos oceanos é o mais rápido desde a última era do gelo; a década de 2010 foi a mais quente dos últimos 125 mil anos e a cobertura de gelo no verão do Ártico é a menor dos últimos mil anos. As pesquisas são categóricas ao afirmar que são mudanças sem precedentes na história recente (IPCC, 2023).

A fim de estimar o menor dano humano e material, a Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu um aumento limite de 1,5 °C até 2050. Para tanto, até 2030, as emissões de carbono na atmosfera devem cair 43%, até 2035, em 60%, e até 2040, em 69%; com relação ao pico de 59 gigatoneladas de carbono equivalente emitidos em 2019. Os pesquisadores do grupo de trabalho II do IPCC também afirmam que o cumprimento das metas depende da redução em 95% do uso do carvão, 60% do petróleo e 45% da gasolina. Além disso, tecnologias de captura de carbono como árvores e microalgas são critérios obrigatórios, não opções alternativas (IPCC, 2023).

É visando a substituição do petróleo por fontes menos agressivas ao clima e mais abundantes que se encontram em desenvolvimento e aprimoramento os biocombustíveis. Essas fontes de energia tem a capacidade de serem menos poluentes, renováveis e dependerem de várias matrizes, não apenas do petróleo. (Wang *et al.*, 2024). De acordo com as suas matérias-primas, podem ser classificados em quatro gerações, como observado na figura 7.



Fonte: O autor (2024).

- Primeira geração: São combustíveis derivados de culturas alimentícias como o biodiesel de soja. Possuem a vantagem de serem provenientes de fontes bem estabelecidas e conhecidas. Porém, a competição por terras agricultáveis e água gera um paradoxo com relação a seu uso em larga escala (Saladini *et al.*, 2016).

- Segunda geração: Os combustíveis derivados de matérias lignocelulósicas, como grama e feno. Não são fontes alimentícias, apesar de concorrer com terras moderadamente agricultáveis. Além disso, requerem processos de pré-tratamento, como é o caso da hidrólise de cascas de madeira (Bharti *et al.*, 2021).

- Terceira geração: Dentre as principais matérias-primas dos combustíveis de terceira geração, as microalgas figuram como protagonistas. Podem crescer em terras não agricultáveis, possuem altas taxas de crescimento, eficiência fotossintética e acúmulo de biomassa, e podem ser cultivadas nos mais diversos meios, não competindo por água potável (Wang *et al.*, 2024).

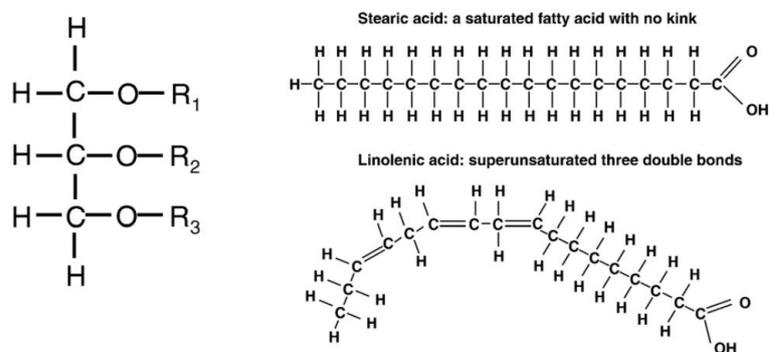
- Quarta geração: Trata-se de um aprimoramento da terceira geração por meio da engenharia genética (Wang *et al.*, 2024).

As propriedades singulares das microalgas fazem com que elas se sobressaiam entre as demais fontes de bioenergia. Além dos principais subprodutos energéticos, elas sintetizam e armazenam lipídios que podem ser transformados em um biodiesel de notável facilidade de aplicação nos motores diesel e excelente desempenho, sendo, até o momento, o biocombustível algal mais promissor (Alishah Aratboni *et al.*, 2019; Wu; Miao, 2014).

3.6.2 Lipídios de microalgas

As microalgas acumulam lipídios no retículo endoplasmático, cloroplasto e citosol, de onde podem ser extraídos e posteriormente convertidos a biodiesel. Podem apresentar função estrutural e de reserva energética, se dividindo em lipídios polares (glico e fosfolipídios) e neutros, como os triacilgliceróis, ilustrados na figura 8, abaixo. Lipídios neutros respondem por 20 a 50% do peso seco da célula e são a matéria-prima ideal para o biodiesel (Pandey *et al.*, 2024).

Figura 8 – Estrutura básica de um triacilglicerol e seus tipos de ácidos graxos formadores possíveis.

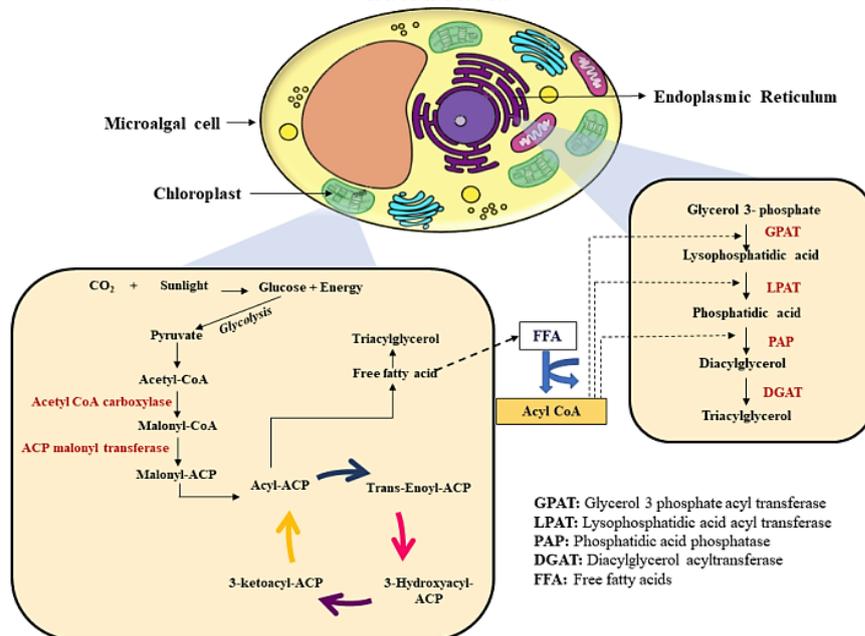


Fonte: Himawan; Starov; Stapley (2006).

Triacilgliceróis (TAG) são os mais relevantes lipídios neutros e são constituídos de ácidos graxos saturados, mono, di ou poli-insaturados. Compostos poli-insaturados como os ácidos α -linolênico (18:3n-3) e eicosapentonóico (20:5n-3) possuem elevadas propriedades nutricionais, em especial como antioxidantes. Entretanto, o melhor desempenho do biodiesel algal está associado a um equilíbrio entre ácidos monoinsaturados e saturados (Mehrabadi; Craggs; Farid, 2016).

A produção de TAG nas células pode se dar no cloroplasto ou no retículo endoplasmático. No primeiro, moléculas de glicose são convertidas a piruvato na rota glicolítica, e posteriormente a acetil-coenzimaA na presença de luz e piruvato-dehidrogenase. Na ausência de luz, o ciclo de calvin produz 3-fosfogliceratos que entram em uma complexa rota metabólica que culmina na produção de ácidos de cadeia longa com 16 a 18 carbonos. Após isso, três ácidos graxos são armazenados junto a uma molécula de glicerol-3-fosfato, originando os triacilglicerídeos.

Figura 9 – Síntese de Triacilgliceróis nas organelas celulares das microalgas via rota autotrófica.



Fonte: Pandey *et al.* (2024)

Quando comparadas à outras culturas oleaginosas, o teor de lipídios encontrado nas microalgas tende a ser muito mais elevado, como pode ser observado na tabela 2, abaixo. Além disso, todo o carbono emitido na queima do biodiesel algal foi proveniente da atmosfera e capturado via fotossíntese. Isso significa que o uso desse biocombustível contribui sobremaneira para os compromissos de carbono zero dos países e empresas (Chhandama *et al.*, 2021).

Tabela 2 – Teor lipídico encontrado em alguns tipos de microalgas.

Espécie de microalga	Teor lipídico total (%m/m)
<i>Botryococcus braunii</i>	44,97
<i>Chorella vulgaris</i>	28,07
<i>Clamydomonas sp.</i>	15,07
<i>Desmodesmus brasiliensis</i>	17,99
<i>Scenedesmus obliquus</i>	16,73
<i>Botryococcus terribilis</i>	49,00
<i>Chlorella emersonii</i>	18,60

Fonte: Adaptado de Chhandama *et al.* (2021).

A produção lipídica nas microalgas está, em primeiro lugar, associada à espécie em questão. Cianobactérias, por exemplo, possuem deficiência de triacilgliceróis, enquanto algas verdes possuem, em média, 25,5% em massa na forma de TAG. Há que se notar também que, em muitas cepas, a alta produtividade de biomassa não está atrelada a altos teores lipídicos, e vice-versa, sendo necessário um equilíbrio entre os dois para uma produção de biodiesel mais econômica (Wang *et al.*, 2024).

Além disso, o regime nutricional ao qual as células algais estão sujeitas e o estresse nutricional são conhecidas ferramentas que induzem ao acúmulo de TAG. No caso do nitrogênio, o estresse induz à redução do crescimento e ao aumento do teor lipídico provavelmente em razão da quebra dos compostos nitrogenados e da clorofila (Negi *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2024). Condições limitadas de fósforo, por sua vez, reduzem as rotas energéticas enquanto aumentam ações metabólicas como a quebra de proteínas e a síntese lipídica, porém em menor quantidade que a deficiência de nitrogênio (Feng *et al.*, 2012).

A condição ambiental também tem influência sobre a acumulação de TAG. A luz, por exemplo, tende a estimular a produção de lipídios polares quando em baixa intensidade e de lipídios apolares, quando em alta intensidade. Entretanto, sabe-se que tanto a escassez quanto a sobrecarga de luz têm a possibilidade de danificar o mecanismo fotossintético, prejudicando crescimento e teor lipídico. O fotoperíodo parece necessitar de etapa escura a fim de evitar a degradação dos pigmentos fotossintéticos, ficando o ideal entre 12:12 e 14:8 de claro:escuro. (Bhandari *et al.*, 2023).

A temperatura, outro fator de importância, frequentemente é espécie-dependente, necessitando de estudos específicos do perfil algal de interesse, mas geralmente gira em torno de 25 a 30 °C. O CO₂, por sua vez, é crucial para a fotossíntese e níveis adequados devem ser fornecidos para uma síntese de TAG relevante. Além disso, o NaHCO₃ também pode ser usado como fonte de carbono e exercer influência na acumulação de lipídios (Wang *et al.*, 2021).

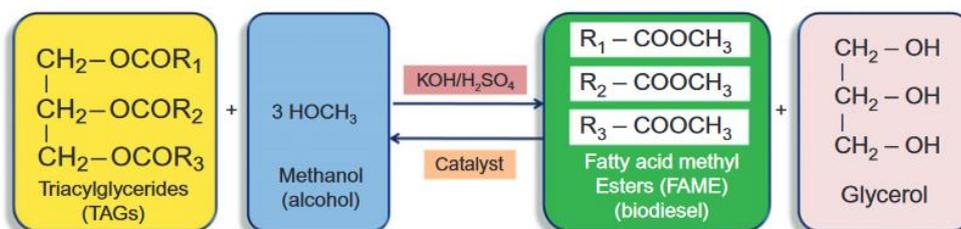
3.6.3 Biodiesel algal e transesterificação

A aplicação do biodiesel de microalgas não necessita de mudanças nos motores diesel nem na infraestrutura associada à distribuição. É um combustível biodegradável, não tóxico e possui 15% em massa de oxigênio. Esse fator faz com que o seja emitido muito menos monóxido de carbono na sua queima, embora uma certa elevação nos níveis de NO_x pode ser observada (Chhandama *et al.*, 2021; Mata; Martins; Caetano, 2010; Tüccar; Aydin, 2013).

Além disso, também são emitidos níveis muito menores de enxofre e materiais particulados na atmosfera. Em diversos estudos, o biodiesel algal já demonstrou atender à padrões de qualidade, como o número de Cetano e o ponto de congelamento (Francisco *et al.*, 2010; Wu; Miao, 2014). O desempenho se deve ao fato dos TAGs serem formados por ácidos graxos C16 e C18 com baixos índices de insaturação, em sua maioria. (Chhandama *et al.*, 2021).

A transesterificação, reação de obtenção do biodiesel, é a conversão de uma molécula de triacilgliceróis em ésteres de ácidos graxos e glicerol. Em geral, usa-se um catalizador ácido ou básico e metanol como álcool, originando os chamados metil ésteres de ácidos graxos (FAME) (Pandey *et al.*, 2024).

Figura 10 - Reação de transesterificação utilizada na produção do biodiesel algal.



Fonte: Pandey (2014)

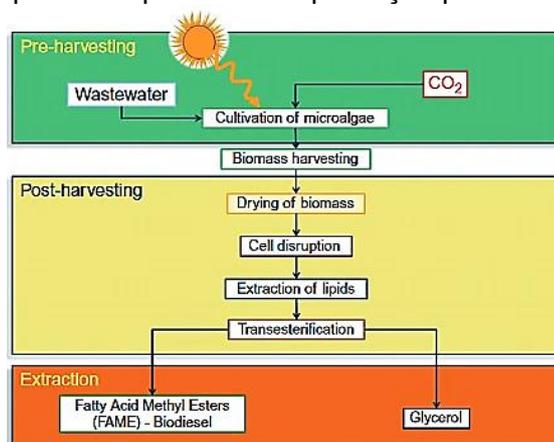
Na catálise ácida, o carbono protonado do grupo carbonila reage com o grupo hidroxila (-OH) do álcool, criando um intermediário tetraétrico. Na catálise básica, um alcóxido nucleofílico é criado com o grupo -OH alcóólico e reage com o grupo -C=O dos triglicerídeos. Apesar de ser mais barata e aproximadamente 4000 vezes mais rápida que a rota ácida, a catálise básica pode causar saponificação pela reação do catalizador com ácidos graxos livres (Chisti, 2007; Halim; Danquah; Webley, 2012).

Uma necessidade à aplicação do biodiesel algal em maior escala é a demanda por meios de cultivo econômicos e acessíveis. A associação entre a produção de bioenergia algal e o tratamento de esgoto doméstico é considerada a estratégia mais viável até o presente momento. As especificidades de cada tipo de efluente devem ser estudadas, visto que concentração de carbono e razão N:P são cruciais à acumulação de lipídios. Além disso, deve ser estudado um protocolo padrão de controle da pureza da biomassa, já que a contaminação reduz o rendimento lipídico (Pandey *et al.*, 2024).

Outra questão é a colheita que, como mencionado é um fator que encarece a produção de biomassa. Enquanto métodos como a centrifugação são custosos, a floculação depende da adição de floculantes químicos (Chandra *et al.*, 2019). Estratégias ecologicamente sustentáveis como a biofloculação encontradas nos AMAB, são essenciais para tornar a colheita econômica (Ummalyma *et al.*, 2017).

Além disso, técnicas de pré-tratamento da biomassa como ultrassom, choque osmótico, moagem por esferas e estresse oxidativo são importantes ferramentas que visam diminuir as quantidades de solventes orgânicos necessários para a extração (Han *et al.*, 2019; Sierra; Dixon; Wilken, 2017). Quanto aos catalizadores, a problemática principal reside na eficiência e recuperação (Pandey *et al.*, 2024).

Figura 11 – Esquema do processo de produção padrão do biodiesel algal.



Fonte: Pandey (2014).

3.6.4 Microalgas como fonte de Biodiesel – LAT+AMAB

Dentre as diversas formas de energia limpa, o biodiesel se mostra como sendo a única a ter o potencial de substituir completamente o petrodiesel (Dutta; Davies; Ikumi, 2018). Além disso, 183 toneladas de CO₂ são necessários para cada tonelada de biomassa algal produzida, contribuindo para a captura eficiente do principal gás do efeito estufa (Chisti, 2008). Espécies como *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica*, *Dunaliella salina*, *Botryococcus sp.*, *Desmodesmus sp.*, *Neochloris sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Tetraselmis sp.* foram capazes de produzir em laboratório um biodiesel que atendesse as normas ASTM (Wang *et al.*, 2024).

Do ponto de vista produtivo, o método de cultivo das microalgas exerce influência sob o rendimento da biomassa, lipídios, subprodutos e tratamento do meio. Portanto, a escolha deve passar por uma rigorosa avaliação. Maliha e Abu-Hijleh (2023) apontaram que o custo por tonelada da biomassa algal seca gira em torno de \$1225 em média, tendo o método considerável participação no valor. Os autores apontam que fotobiorreatores tendem a produzir biomassas com custo médio de \$1737 por tonelada de biomassa seca, enquanto lagoas de alta taxa produzem a um custo de \$494 por tonelada.

Apesar de vários dos desafios impostos quanto à contaminação e dificuldade de controle de parâmetros, as lagoas de alta taxa são preferíveis em razão do seu custo-benefício e por oferecer grandes áreas superficiais, fator crucial ao cultivo algal (Pandey *et al.* 2024). Por exemplo, Sharma *et al.* (2021) produziram uma biomassa predominantemente de *Chlorella minutissima* em LAT de 1500L com teor lipídico de 19,98% e os ésteres metílicos foram capazes de atender todos os padrões das normas ASTM D6751 e EM 14214.

A produtividade de biomassa e subprodutos em sistemas abertos é uma questão frequentemente levantada e avaliada. Zhang *et al.* (2018) estimaram uma produção de 7,47 a 10,10 ton.ha⁻¹.ano⁻¹ de lipídios extraídos da biomassa oriunda de uma lagoa de alta taxa com biofilme vertical. A produção de biodiesel ficaria em 0,57-1,15 ton.ha⁻¹.ano⁻¹, enquanto o volume de biogás produzido a partir da biomassa extraída seria 21.471 a 29.139 m³.ha⁻¹.ano⁻¹.

Bell *et al.* (2016) verificaram que os principais fatores de correlação com a permanência da microalga inoculada (*Chlorella sp.*) em uma lagoa de alta taxa de 200

L foram o nível de fosfato e o controle do pH. A pesquisa demonstrou que é possível manter a pureza de cultivos abertos acima de 90% utilizando as estratégias corretas. A qualidade dos lipídios mostrou excelente desempenho na pesquisa de Jarungkeerativilom *et al.* (2023), onde a biomassa de *Anjistrodesmus sp.* em uma lagoa de alta taxa de 100 L demonstrou perfil semelhante ao óleo de palma.

Por fim, o tratamento do efluente, tão importante no barateamento do biodiesel, não parece ser um empecilho quando se operam em lagoas de alta taxa associadas à extração de óleos. Arora *et al.* (2020) trataram água fluvial poluída com o objetivo de uso na aquicultura e produção de lipídios, vindo a obter remoções de NTK de 97% e fósforo total de 95%. Além disso, a lagoa de alta taxa de 75 L inoculada com *Chlorella sorokiniana* foi capaz de produzir uma biomassa com teor lipídico de 31%.

Condições de escassez de CO₂ podem inibir o acúmulo de lipídios e, portanto, o suprimento adequado é essencial (Wang *et al.*, 2024). É bem conhecido que a relação simbiótica entre bactérias e microalgas pode vir a manter níveis sempre adequados do CO₂, evitando decaimentos na produtividade de biomassa e subprodutos energéticos. Portanto, é de se esperar que agregados alga-bactéria sejam objeto de estudo como fonte de biodiesel.

He *et al.* (2022) utilizaram efluente pré-tratado de cervejaria em fotobiorreatores no cultivo de AMAB a partir de *Chlorella sorokiniana* e lodo ativado. A remoção de amônia do estudo alcançou 96%, enquanto o teor de lipídio alcançou o nível excelente de 34,9%. Ao utilizar esgoto e lixiviado de aterro Hernández-García *et al.* (2019) foram capazes de remover 82% de N-NH₄⁺ e 43% de ortofosfato, com agregados de *Desmodesmus sp.* e lodo ativado, obtendo 20% de teor lipídico.

A proporção entre microalgas e bactérias já demonstrou ser um fator de importância. Satiro *et al.* (2024) verificaram a influência das proporções de start-up em um fotobiorreator tubular para o tratamento de esgoto de indústria de papel. Os autores observaram que os maiores teores lipídicos foram encontrados na proporção inicial de 100:500 de alga:bactéria, enquanto a melhor interação simbiótica foi observada na proporção de 100:100. Em outro estudo, Satiro (2021) observou que grandes porções de inoculação de lodo - na faixa de 0,5 g.L⁻¹ - ocasionam autossombreamento em lagoas de alta taxa, dificultando a colonização de microalgas.

Xu *et al.* (2016) confirmaram a escassez nutricional como ferramenta para a produção lipídica no caso da operação com agregados-microalga bactéria. Na

pesquisa, o consórcio *Chlorella vulgaris* e lodo ativado evidenciou melhoras na sedimentabilidade e acúmulo lipídico de 17,1%. Além disso, o controle do pH em valores próximos à 7,0 novamente demonstrou influência na melhoria do teor lipídico na pesquisa de Bélanger-Lépine *et al.* (2018).

A união da operação de lagoas de alta taxa com agregados microalga-bactéria (LAT-AMAB) pode incluir, além da produtividade, ganhos nos teores lipídicos, como observado no estudo já citado de Sátiro (2021). O autor operou 3 lagoas de alta taxa de alturas úteis variáveis. A Lagoa sem adição de lodo ativado e altura de 0,3 m obteve 9,55%, enquanto as lagoas com agregados e alturas de 0,3 m e 0,5 m alcançaram 11,5% e 18,4% de lipídios, respectivamente.

Dados sugerem que a operação em regime semi-contínuo é uma estratégia aplicável para a produção de microalgas e acumulação de lipídios. Entretanto, em raras vezes foram reportados estudos em escalas piloto e real, submetidas às intempéries do clima. Ho *et al.* (2014) sugerem que o uso de processos semi-contínuos para a produção de biodiesel de microalgas deve passar por mais estudos para a comprovação da sua viabilidade.

Van Den Hende *et al.* (2014) afirmam que em escala industrial, deve-se cultivar agregados microalga bactéria sob batelada sequencial em lagoas de alta taxa por tais reatores serem os mais baratos, fáceis de instalar e operar e apresentar cultivos de microalgas mais duráveis. Além disso, o fornecimento de CO₂ pelas bactérias heterotróficas durante picos de aporte de matéria orgânica, no início de cada batelada, pode ser uma estratégia para a remediação dos impactos da alcalinização dos cultivos de microalgas.

Entretanto, o perfil lipídico dos agregados microalga-bactéria encontrados durante a operação em lagoas de alta taxa ao longo de grandes períodos de operação ainda é de escasso conhecimento. As intempéries de clima e contaminação externa necessitam de melhor compreensão para sua otimização. Entretanto, a resiliência e produtividade satisfatória não serão suficientes se os lipídios produzidos gerarem um biodiesel cuja qualidade não contribua para a transição energética.

Portanto, um entendimento do perfil lipídico dos agregados microalga-bactéria, suas propriedades e respostas ao longo da operação em lagoas de alta taxa sob batelada sequencial, se faz necessário, tendo em vista ser esse um processo de produção ecologicamente alinhado às demandas do clima.

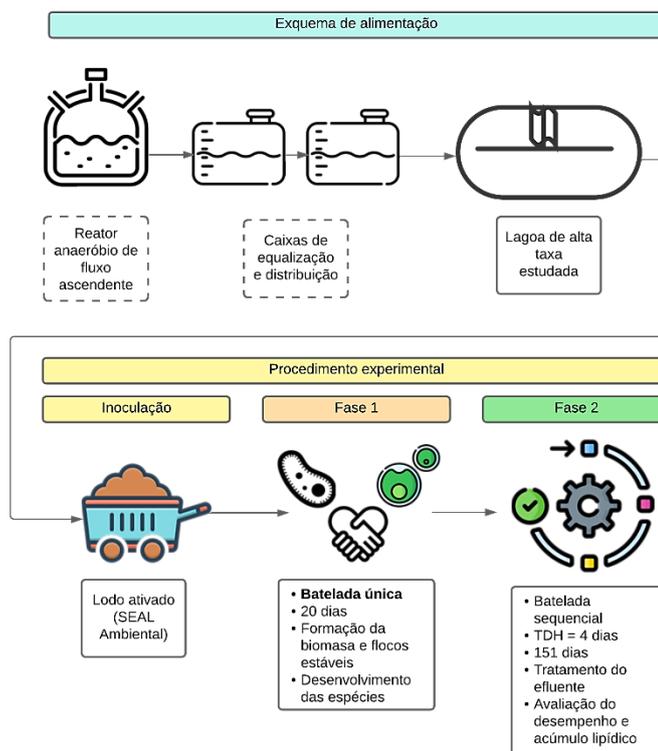
4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido em uma lagoa de alta taxa localizada na estação de tratamento de esgoto Mangueira (ETE-Mangueira), de propriedade da Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA) e administrada pela BRK ambiental. A estação se localiza na cidade de Recife, nas latitudes 8°04'40.22" ao sul e longitude 34°55'29.39" ao oeste, e trata esgoto doméstico dos bairros da Mangueira, San Martin.

4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O esquema de alimentação da lagoa já instalado nas dependências da estação, e o procedimento experimental da pesquisa estão ilustrados na figura 12, abaixo.

Figura 12 - Fluxograma de alimentação de esgoto na lagoa e procedimento experimental seguido.



Fonte: O autor (2024).

O efluente pré-tratado por reator anaeróbico era deslocado para um tanque de equalização e bombeado para uma caixa de distribuição, de onde seguia para a lagoa. No dia zero de operação, foi inoculado no sistema lodo ativado e dado início à fase de

formação da biomassa algal-bacteriana, durando 20 dias. Verificada a formação, foi iniciada a etapa de bateladas sequenciais, que durou 151 dias.

4.2. PARÂMETROS DA LAGOA E DE MISTURA

A lagoa de alta taxa em escala piloto utilizada (figura 13) foi construída em compósito à base de fibra de vidro e resina plástica e faz parte de um sistema experimental operado e estudado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Saneamento Ambiental. As dimensões correspondentes são encontradas abaixo.

Figura 13 - Lagoa de alta taxa operada durante o estudo.



Fonte: O autor (2024).

Tabela 3 - Parâmetros construtivos da lagoa de alta taxa utilizada.

Característica	Valor
Comprimento (m)	6,0
Largura (m)	1,4
Comprimento da chicana (m)	5,6
Espessura da chicana (m)	0,1
Altura da chicana (m)	0,9
Altura (m)	0,9
Altura máxima da lâmina d'água (m)	0,7
Área superficial total (m ²)	8,0
Volume útil máximo (m ³)	5,6
Volume total (m ³)	7,2

Fonte: O autor (2024)

Para a movimentação da massa líquida ao longo do cultivo, foi utilizado um sistema motor-redutor instalado na lagoa e com os parâmetros descritos na tabela 4, abaixo.

Tabela 4 – Parâmetros operacionais do sistema de agitação.

Característica	Grandeza
Marca e modelo dos redutores	GREMIA GS63
Marca e modelo dos motores	WEG W22
Marca e modelo dos inversores de frequência	WEG CFW08
Potência do motor-redutor	1 cv com redução de 1:40
Comprimento da mesa de apoio do motor-redutor (m)	0,3
Largura da mesa de apoio do motor-redutor (m)	0,3
Altura da mesa de apoio (m)	0,85
Diâmetro do eixo do motor (m)	0,02
Nº de pás do rotor	4
Diâmetro do eixo do rotor (m)	0,04
Comprimento do eixo do motor + rotor	1,7
Distância do rotor ao fundo da lagoa (m)	0,15
Distância do rotor às bordas da lagoa (m)	0,05
Distância da chicana para o eixo do rotor (m)	0,98
Diâmetros dos rotores (m)	1,4

Fonte: O autor (2024).

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO INÓLUCO

Para a formação dos agregados alga-bactéria foi utilizado lodo doado pela empresa de tratamento de esgotos Suape Empreendimentos Ambientais (SEAL), localizada no Cabo de Santo Agostinho, PE. A estação tem capacidade para tratar 100 m³/h de esgoto industrial e doméstico e conta com o tratamento de Lodos Ativados, do qual proveio o lodo, coletado após o descarte de fundo do decantador secundário. Na tabela 5, encontram-se as características do lodo floculento.

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos do lodo utilizado na formação da biomassa AMAB

Parâmetro	Média
DQO (mg/L)	11775,8
NTK (mg/L)	234,2
Fósforo Total (mg/L)	88,0
SSV (mg/L)	7756,7

Fonte: O autor (2024).

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A LAT estudada recebeu como substrato o esgoto doméstico pré-tratado por reator anaeróbio de fluxo ascendente da estação mangueira. O reator se compõe de 8 módulos que, juntos, operam em vazão diária de projeto de 31,86 L.s⁻¹, TDH de 8 horas e vazão máxima horária de operação 51,10 L/s. As características médias obtidas a partir de estudo anterior encontram-se descritas na Tabela 6. As efetivas concentrações foram medidas ao longo do estudo conforme será descrito.

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do efluente pré-tratado por UASB.

Parâmetro	Unidade	Média
pH	-	7,25 ± 0,33
Oxigênio Dissolvido	mg/L	0,27 ± 0,34
Temperatura	°C	29,20 ± 1,12
Condutividade	µS/cm	1242,00 ± 71,26
Salinidade	%	0,52 ± 0,08
Alcalinidade total	mg/L	243,51 ± 58,36
DQO	mg/L	160,51 ± 96,11
DBO	mg/L	80,00 ± 42,43
NTK	mg/L	35,25 ± 6,58
N-NH ₄ ⁺	mg/L	24,45 ± 7,43
Fósforo Total	mg/L	5,40 ± 1,33
Sólidos Suspensos Voláteis	mg/L	60,33 ± 54,14

Fonte: Sátiro (2022).

4.5. FASE 1 – FORMAÇÃO DA BIOMASSA

O experimento da pesquisa se dividiu em 2 fases. Na primeira, foi feita a inoculação da lagoa para a formação dos agregados durante uma batelada única, o que durou 20 dias. Após isso, iniciou-se a fase em operação em batelada sequencial, que durou 151 e teve o objetivo de verificar o tratamento do efluente, características da biomassa, produtividade de lipídios e FAMES.

Como recomenda a literatura, a fim de desenvolver os flocos de microalga-bactéria, o lodo ativado foi adicionado à LAT no dia 0 de operação, iniciando-se a fase 1 (Arcila; Buitrón, 2017; Dos Santos Neto *et al.*, 2021). Em trabalho prévio usando o mesmo sistema e origem do lodo da presente pesquisa, Sátiro (2021) verificou que

valores próximos a 500 mgSSV.L^{-1} de lodo causaram autossombreamento, dificultando a formação da biomassa. Na ocasião, chegou-se uma faixa operável de 180 mgSSV.L^{-1} na lagoa somando-se lodo e efluente.

Portanto, no dia 08 de fevereiro de 2023 iniciou-se a fase 1 ao serem inoculados 180 mg.L^{-1} de lodo ativado na LAT em estudo, o que representou 55,73 L de lodo. O volume da lagoa foi completado até atingir a altura útil de 30 cm, totalizando um volume útil de $2,4 \text{ m}^3$. Iniciou-se também os monitoramentos que serão descritos adiante e tiveram o objetivo de verificar a formação, integridade e desempenho das espécies de microalgas e do AMAB.

4.6. FASE 2 – OPERAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL

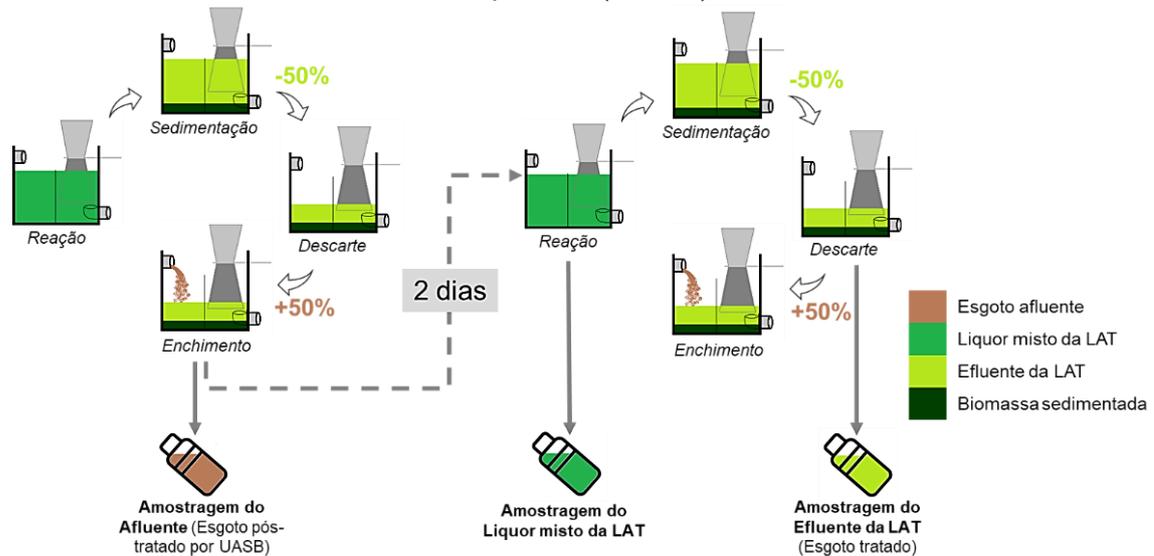
Após 20 dias de operação em batelada única, verificou-se a formação do agregado microalga-bactéria com sucesso, iniciando-se a fase 2 de operação em batelada sequencial, que durou 151 dias. No 20º dia de operação, cessou-se a agitação dos rotores da lagoa, permitindo à biomassa um período de sedimentação de 30 minutos. Após isso, secou-se 50% do conteúdo por meio de válvula instalada na lagoa, o que permitiu que apenas o sobrenadante clarificado fosse retirado, enquanto os flocos concentrados de AMAB permaneceram no fundo.

Após a descarga, foi ligada a agitação próximo ao máximo a fim de garantir a homogeneidade da próxima batelada, normalizando-se após alguns segundos no valor estipulado de 0,5 m/s. Em seguida, o enchimento de 50% com esgoto pós-UASB foi iniciado, totalizando 1200 Litros, processo que tomou 2 horas e 30 minutos. O processo descrito foi repetido a cada 2 dias ao longo da operação da Fase 2, totalizando um TDH de 4 dias. O valor de troca volumétrica de 50% foi estipulado com base em pesquisas prévias de microalgas e agregados microalga-bactéria em regime de bateladas sequenciais utilizando fotobiorreatores tubulares, tendo em vista o baixo número de estudos desse tipo de regime hidrodinâmico que foquem em lagoas de alta taxa (Otero; Fábregas, 1997; Sales *et al.*, 2022).

Em razão das flutuações e sazonalidades dos parâmetros do esgoto afluente ao longo dos dias, foi desenvolvido o esquema de coleta de amostras ilustrado na figura 7, abaixo. No primeiro dia útil de cada semana que incluísse troca volumétrica (início da primeira batelada da semana), eram retiradas amostras do esgoto afluente,

adiante chamadas AF, logo na sua entrada na lagoa. Após 2 dias, na troca volumétrica subsequente, eram coletadas amostras do liquor misto da lagoa logo na chegada à estação. Durante o processo de descarte, era coletada a amostra de efluente tratado. Liquor misto e efluente serão adiante chamados de LM e EF, respectivamente.

Figura 14 - Esquema de coleta amostral da LAT durante a operação em batelada sequencial (Fase 2).



Fonte: O autor (2024).

A subtração entre os valores de AF e EF permitiram a estimativa do tratamento do efluente, isto é, a remoção de nutrientes e matéria orgânica. Análises da biomassa foram realizadas, em sua maioria, das amostras de LM. Cada troca volumétrica era feita entre 9 e 10 horas da manhã dos dias correspondentes

4.7. MÉTODOS ANALÍTICOS

Adiante, são descritas as análises do Afluente, Efluente e Liquor misto.

4.9.1. Parâmetros *in situ*

Na Tabela 7, encontram-se os parâmetros físico-químicos *in situ* analisados, bem como o método utilizado e frequência de realização em cada uma das fases. Na fase 2, as análises eram realizadas antes da troca volumétrica e, em ambas as etapas da pesquisa, em torno das 8:30 da manhã.

Tabela 7 - Parâmetros in situ medidos na lagoa.

Parâmetro	Método	Frequência (Fase 1)	Frequência (Fase 2)
pH			
Oxigênio Dissolvido	Potenciométrico		
Potencial Redox	(Multiparâmetro	3x por semana	Semanal
Condutividade	HACH CO HQ40d)		
Salinidade			
Radiação	Radiômetro (PAR) HD 2102.2	Semanal	Semanal

Fonte: O autor (2024).

4.9.2. Remoção de matéria orgânica e nutrientes

Na tabela 8, abaixo, são elencadas as análises químicas realizadas na fase 1 e 2 do experimento. Na fase 1, as amostras foram coletadas diretamente na lagoa durante o processo de batelada única com frequência de 2 a 3 vezes por semana. Na fase 2, o esquema da figura 14 foi obedecido, indicando análises de afluente (esgoto pós-UASB) e efluente tratado pela LAT com frequência semanal.

Tabela 8 - Dados físico-químicos analisados nas fases 1 e 2.

Parâmetro	Método
DQO	Colorimétrico – Método 5220-C
NTK	Titulométrico Método 4500 Norg - B
N-Amoniaco	Titulométrico 4500 NH3-B e C
Nitrito	Cromatografia iônica
Nitrato	Cromatografia iônica
Fósforo Total	Colorimétrico – Método 4500 P- C
Alcalinidade	Titulométrico – Método 2320-B

Fonte: (APHA; AWWA; WEF, 2012).

4.8. FORMAÇÃO DA BIOMASSA

Adiante são descritas as análises realizadas com o intuito de observar o desempenho da biomassa, seu desenvolvimento e características microbiológicas. Todas foram realizadas a partir do liquor misto da lagoa. Porém, na fase 1 apenas realizaram-se as análises de sólidos suspensos voláteis (SSV), microscopia Clorofila-

a e materiais poliméricos extracelulares (EPS) com frequência de 2 a 3 vezes por semana. Na fase 2 todas as análises foram realizadas e a frequência foi semanal.

4.8.1. Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Foram realizadas as análises de sólidos suspensos voláteis na lagoa a fim de determinar o crescimento e manutenção da biomassa durante o período de experimento. A metodologia utilizada foi a padrão para este tipo de amostra, encontrada no Standard Methods for Analisation of Water and Wastewater (APHA; AWWA; WEF, 2012). O procedimento foi feito em triplicatas e as amostras foram coletadas em seguida ao rotor de mistura da lagoa. Utilizaram-se os dados de SSV para o cálculo da produtividade por meio da equação obtida de Dos Santos (2023)

$$\text{Produtividade (g.m}^{-2}\text{.d}^{-1}) = \frac{\text{SSV (} \frac{\text{g}}{\text{m}^2} \text{) } \times \text{Vol. do reator (m}^3\text{)}}{\text{Área sup. (m}^2\text{) } \times \text{TDH (d)}} \quad (14)$$

4.8.2. Identificação e quantificação celular

A partir do liquor misto da lagoa, foi realizada a análise visual das microalgas por identificação em microscópio comum Leica DMIL em ampliação de até 40x. A identificação dos gêneros foi fundamentada por meio da descrição taxonômica descrita em Bicudo e Menezes (2000) e associada à literatura. A abundância relativa foi avaliada em microscópio invertido Leica 1500, usando uma câmara de Utermohl de 2 ml, tempo de sedimentação mínimo de 2 horas e resolução de 40x. Calculou-se a densidade total e específica de acordo com (Alveal Villena *et al.*, 1995), de acordo com as equações 15 e 16 abaixo .

$$D = \frac{N_c}{V_c} \quad (15)$$

$$V_c = \frac{A_c + V}{A_t} \quad (16)$$

Onde:

D = Densidade específica de células (cel.mL⁻¹);

N_c = Número de células contadas de um mesmo gênero;

V_c = Volume de amostra contada;

A_c = Área contada;

V = Volume da amostra sedimentada em câmara de Utermohl;

A_t = Área total da câmara de Utermohl;

O cálculo da abundância relativa foi realizado com base na contribuição percentual de cada gênero utilizando a metodologia de Lobo e Leighton (1986), descrita na equação 17, abaixo, sendo “n” o número de indivíduos em cada táxon e “ N_t ” o número total de indivíduos em todos os táxons.

$$\text{Abundância (\%)} = \frac{n \times 100}{N_t} \quad (17)$$

Quando necessário, as amostras foram preservadas com solução de lugol a 5% (Brandão *et al.*, 2011). A dominância dos gêneros se classifica em: 1) dominante (abundância maior que 50%); 2) abundante (abundância relativa entre 30 e 50%); 3) pouco abundante (entre 10 e 30%) e 4) rara (menor que 10%).

No dia 135 foi realizada contagem de zooplânctons na lagoa, realizada por meio da filtração de 100 mL do liquor misto em peneira de aço Mesh 48. A biomassa retida foi suspensa em solução de formol com sacarose, como indica Brandão *et al.* (2011). Por fim, avaliou-se a abundância relativa de zooplânctons em câmara de Sedgewick-rafter de 1 mL e microscópio Leica DMIL.

4.8.3. Clorofila-a

Monitorou-se o desenvolvimento das microalgas de forma isolada ao agregado microalga-bactéria por meio da análise de clorofila-a. A metodologia utilizada se baseou no procedimento descrito em (Leong *et al.*, 2018).

Na frequência já descrita, um volume de 40 mL das amostras de liquor misto era centrifugado a 4000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante era descartado, ao que se adicionava 20 mL de acetona 90% e 0,05g de CaCO_3 . Os tubos eram envoltos em papel alumínio e postos ao abrigo da luz em congelador por 24h. Após o tempo, novamente centrifugavam-se as amostras a 4000 RPM por 10 minutos e eram feitas leituras do sobrenadante, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 750

nm, 663 nm, 645 nm e 633 nm. Os resultados de absorvância foram aplicados na seguinte equação a fim de indicar o valor de clorofila-a.

$$\text{Clorofila-a (mg/L)} = \frac{[(11,64(\text{ABS}_{663}-\text{ABS}_{750})-2,16(\text{ABS}_{645}-\text{ABS}_{750})+0,10(\text{ABS}_{630}-\text{ABS}_{750}))]\times V1}{V} \quad (18)$$

Onde:

V = Volume de amostra utilizado;

V1 = Volume de acetona 90% adicionado;

4.8.4. Granulometria

A análise de granulometria foi realizada para verificar a distribuição de tamanho dos flocos desenvolvidos. A avaliação foi feita em dias específicos ao longo da fase 2 do experimento a partir do liquor misto segundo Bin *et al.* (2011) e incluiu a passagem de 100 mL da amostra por 3 peneiras de aço de diâmetro de poro 1,0 mm, 0,5 mm, 0,25 mm. Após isso, cada peneira foi lavada com água deionizada, coletando-se a biomassa. Cada fração foi averiguada segundo a metodologia de SSV.

4.8.5. IVL30

O índice volumétrico de lodo é um importante fator associado à sedimentação de um lodo. Assim, em associação com o valor de concentração de sólidos, quanto menor o valor de IVL30, maior será a sedimentabilidade e compactabilidade do lodo. Portanto, é um parâmetro essencial para caracterizar a facilidade de separação do AMAB do meio de cultura, propriedade essencial à valoração da biomassa hora produzida.

O procedimento foi realizado semanalmente a partir das coletas de LM da fase 2, seguindo o descrito no trabalho de Schwarzenbeck, Erley e Wilderer (2004). Um litro de liquor misto era aferido em provetas de vidro de 1000 mL, aguardando-se 30 minutos para a leitura do IVL30. O valor medido foi aplicado na equação 19, abaixo.

$$\text{IVL}_{30} = \frac{\text{VLS} \times 1000}{\text{SST}} \quad (19)$$

Onde:

VLS = Volume de lodo sedimentado em 30 minutos;

SST = sólidos suspensos totais.

4.8.6. Eficiência de floculação

Outro parâmetro adequado para medir a sedimentabilidade do lodo é a eficiência de floculação, medida mais direta da clarificação do efluente após o tratamento. A análise foi realizada nas amostras de liquor misto da fase 2 e consistiu, primeiro, na homogeneização e leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de $\lambda = 650$ nm. Após isso, a alíquota era deixada para repousar por 20 minutos. Após o período, o sobrenadante tinha sua densidade óptica medida nas mesmas condições. A eficiência de floculação foi obtida a partir da equação 20, abaixo, onde “F” é a absorbância da amostra não homogeneizada e “I” é a absorbância da amostra homogeneizada, ambas em $\lambda = 650$ nm.

$$\text{Eficiência de Floculação} = \left(1 - \frac{F}{I} \right) \times 100 \quad (20)$$

4.8.7. Substâncias poliméricas extracelulares

Como já foi tratado, as substâncias poliméricas extracelulares são polímeros catiônicos relacionados com a neutralização dos grupos funcionais aniônicos presentes nas paredes celulares das microalgas. Portanto, esse fator é intrinsecamente ligado à formação dos agregados AMAB, sendo necessária sua avaliação constante.

Em primeiro lugar, foi realizada a etapa de extração do EPS segundo Arcila; Buitrón (2017). Um volume de 40 mL de liquor misto da fase 2 era centrifugado a 4000 RPM por 20 minutos. Após isso, o sobrenadante era descartado e o pelet de biomassa AMAB recebia 15 mL de solução NaCl 0,9%, sendo homogeneizado em vórtex em seguida. O tubo plástico era então posto em banho maria a 90 °C por 60 minutos. Após esse procedimento, a amostra era novamente centrifugada por 20 minutos a 4000 RPM. O sobrenadante era filtrado em membranas de fibra de vidro de diâmetro

de poro 1,2 µm e direcionado às análises de polissacarídeos, segundo DuBois *et al.* (1956), e proteínas, segundo Lowry *et al.* (1951) e Walker (2009).

4.8.7.1. Polissacarídeos

A análise de polissacarídeos seguiu a metodologia descrita por DuBois *et al.* (1956). A análise consistiu na medição de 0,5 mL do filtrado obtido na etapa anterior de extração do EPS em tubos de vidro rosqueáveis de 15 mL. Seguiu-se a adição de 0,5 mL de solução de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, realizando-se o mesmo procedimento para um branco com água deionizada. As amostras eram postas ao abrigo da luz para o complemento da formação da cor, definido no momento de normalização das temperaturas das amostras.

As amostras eram então lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm. Os resultados de absorvância foram aplicados em curvas analíticas realizadas para o conjunto equipamento e solução de fenol 5%, resultando em mg/L de EPS do tipo carboidrato.

4.8.7.2. Proteínas

O EPS do tipo proteína foi determinado segundo a metodologia de Lowry *et al.* (1951) e Walker (2009) a partir do extrato de EPS obtido no procedimento descrito no tópico 4.8.7. Para cada amostra, alíquotas de 1 mL eram adicionadas em tubos de vidro rosqueáveis de 15 mL. Em seguida, preparava-se uma solução combinada a partir de 50 mL de Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,1N, 0,5mL de CuSO₄.5H₂O 1% e 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio 2%. Os volumes poderiam ser variados respeitando a proporção 100:1:1, respectivamente. Media-se, então, 2 mL desse reagente combinado e adicionava-se em cada uma das amostras, permanecendo 10 minutos a fim de permitir a formação do complexo colorido.

Após o tempo indicado, adicionava-se 0,5 mL solução de Folin 1N, feita a partir da diluição 1:1 do reagente Folin comercial. As amostras eram postas ao abrigo da luz por 30 minutos para efetiva formação da cor. Terminado o tempo, media-se a densidade óptica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm. O valor de EPS proteína em mg/L era obtido a partir da aplicação dos valores de absorvância

em curva analítica com albumina bovina e preparada para o conjunto de soluções de complexação, solução de Folin formadora de cor e espectrofotômetro.

4.9. AVALIAÇÃO LIPÍDICA

A avaliação lipídica é a uma das etapas mais importantes na produção de uma biomassa com perspectiva de uso na produção de biodiesel. A primeira etapa para este fim foi a coleta e preparação da biomassa algal-bacteriana, que seguiu frequência semanal durante a coleta de LM e EF, e foi feita no lodo AMAB acumulado no fundo durante a fase de sedimentação da lagoa. O nível da lâmina d'água em 50% permitiu a coleta manual de 100 a 200 mL de flocos concentrados, que foram centrifugados a 3000 RPM por 10 minutos. Os pellets de biomassa eram, então, secos em estufa de circulação de ar a 60 °C por 24h.

Após a secagem, a biomassa era pulverizada em moinho willey com peneira Mesh 30. Resíduos não adequadamente pulverizados eram macerados manualmente com almofariz e pistilo. Ao final, toda a biomassa era novamente peneirada em peneira de aço Mesh 50, adiante chamada de biomassa seca, que foi armazenada em congelador a -20 °C (Grima *et al.*, 1994) até ser utilizada nos processos de extração e quantificação dos lipídios produzidos durante o experimento.

4.11.1. Extrações e quantificação lipídicas

Foram utilizadas três metodologias de extração da biomassa algal-bacteriana a fim de se comparar os desempenhos ao longo do tempo. O primeiro método a ser citado é o de Bligh e Dyer (1957) (BD), metodologia comumente utilizada para microalgas. Em primeiro lugar, amostras de biomassa seca entre 100 e 200 mg foram pesadas em tubos Falcon de 50 mL com balança analítica. Adicionava-se, então, 4 mL de água deionizada, nos tubos, homogeneizando-se a suspensão. Pipetava-se 10 mL de metanol e 5 mL de clorofórmio, nesta ordem, e o tubo era fechado e homogeneizado em vórtex por 2 minutos. Após isso, adicionava-se mais 5 mL de clorofórmio e 5 mL de água deionizada, homogeneizando em vórtex por 30 segundos a cada adição. A suspensão do tubo era, então, filtrada em papel qualitativo e posta

em funil de separação para a partição do líquido, coletando-se a fase inferior, rica em lipídios.

A segunda metodologia de extração de lipídios é encontrada em Folch; Lees e Stanley, (1957) (FO) e parte da pesagem de 100 a 200 mg de biomassa seca em Erlenmeyer. Adicionava-se 40 mL de solução de clorofórmio:metanol 2:1, permanecendo sob agitação e ao abrigo da luz por 30 minutos. Desenvolvida para a análise de tecidos humanos, a metodologia originalmente sugere uma proporção de 20 mL de solução extratora para cada grama de amostra, considerando 3,25% de lipídios para músculo humano. Entretanto, teores algais tendem ser 10 vezes maiores. Assim, optou-se por aumentar as proporções dentro dos valores já apontados.

Em seguida à agitação, a amostra recebia 8 mL de água, sendo agitada por 30 segundos, filtrada em papel qualitativo e posta em funil de separação para a partição em 2 fases. A fase inferior, rica em lipídios e clorofórmio, era coletada.

A terceira e última metodologia foi a extração da biomassa em tubo Soxhlet (SO) (Halim; Danquah; Webley, 2012; He; Yang; Hu, 2016; Qu; Miao, 2021). Entre 100 e 200 mg de biomassa seca eram pesadas em cartuchos de celulose, postas em equipamento Soxhlet com mistura extratora de clorofórmio:metanol 2:1 e aquecida a 90°C por 6 horas.

Os três extratos produzidos pelas metodologias acima descritas passaram pelo mesmo processo de quantificação dos lipídios totais. Foi feita a secagem com rotoevaporador e vácuo sob temperatura de 60°C. O balão de vidro utilizado foi limpo, seco em estufa a 105 °C e tinha seu peso registrado antes e após a secagem do solvente, permitindo o cálculo do teor de lipídios totais por meio da equação 21.

$$\text{Teor lipídico (\%)} = \frac{(Me - Ms)}{m} \times 100 \quad (21)$$

Onde:

Ms = Massa do balão seco;

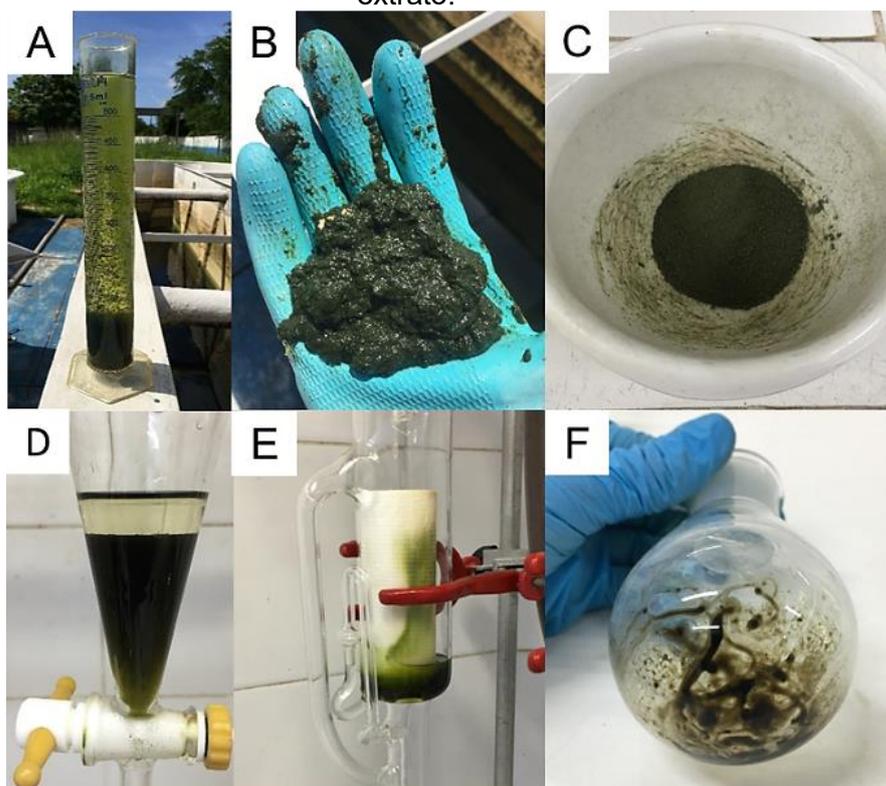
Me = Massa do balão com o extrato lipídico;

m = massa de pó seco de AMAB medida para a extração.

Após a quantificação, os balões recebiam 2 mL de clorofórmio grau cromatográfico e a solução lipídica transferida para tubos de vidro rosqueáveis de 15

mL e armazenados até sua derivatização e análise cromatográfica por no máximo 30 dias. A redução do headspace, proteção contra o oxigênio e luz e baixas temperaturas visam proteger os lipídios poli-insaturados de ataques oxidativos (Medina *et al.*, 1998).

Figura 15 - Etapas da extração de lipídios da biomassa AMAB: Colheita (A), concentração (B), secagem e moagem (C), extração por BD ou FO (D) e Soxhlet (E) e rotaevaporação do extrato.



Fonte: O Autor (2024).

4.11.2. Derivatização e análise cromatográfica

A análise dos lipídios por cromatografia gasosa permite a identificação dos ácidos graxos que compõe o extrato. Antes, porém, a derivatização das amostras é necessária, já que muitos ácidos se encontram na forma de tri, di ou monoacilgliceróis.

A derivatização escolhida se encontra descrita por Indarti *et al.* (2005) e se deu a partir dos extratos armazenados conforme descrito no tópico anterior. Já contendo os extratos dos lipídios dissolvidos em 2 mL de clorofórmio para cromatografia, os tubos receberam 2 mL de solução 10% H₂SO₄ em metanol. Foram então rosqueados, agitados em vórtex por 1 minuto, envoltos em papel alumínio e adicionados em bloco digestor a 100 °C por 30 minutos.

Ao final do tempo, os tubos foram retirados e adicionou-se 1 mL de água deionizada após atingirem temperatura ambiente. Após mais 2 minutos de agitação em vórtex, o conteúdo do tubo se separava em 2 fases, uma inferior, orgânica e rica em metil ésteres de ácidos graxos (FAME) e clorofórmio, e uma superior, aquosa e rica em metanol, água e ácido sulfúrico. Com pipeta de pasteur, cuidadosamente retirava-se aproximadamente 1 mL do conteúdo da fase inferior sem contaminação da fase superior, adicionando-se o volume tomado em vials para cromatografia.

Todas as amostras foram identificadas por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (FID). O modelo de cromatógrafo utilizado foi o Agilent 7890A. A injeção utilizada foi do tipo Split de 1 µL com temperatura do injetor a 250 °C e razão de split 5:1. O gás de arraste foi hidrogênio na vazão de 1 mL.min⁻¹. A temperatura inicial da coluna analítica foi de 50 °C por 5 minutos, seguida de elevação a taxa de 10 °C.min⁻¹ até 200 °C e, imediatamente, aumentando à 5 °C.min⁻¹ até 240 °C, ficando por 10 minutos nessa temperatura, o que totalizou 38 minutos para cada corrida. A coluna usada foi a Agilent® J&W GC Column DB-Wax de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme 0,25 µm, tendo polietilenoglicol como fase estacionária (MCCURRY; AGILENT TECHNOLOGIES, 2012).

A identificação dos ácidos graxos se deu baseada em curvas analíticas preparadas a partir de 21 padrões de FAME, observados na tabela A1 e foram adquiridos em kits da MERK®-Sigma Aldrich. As concentrações em mg/L obtidas com as curvas analíticas foram utilizadas nas equações abaixo para estimar a massa de cada tipo de FAME, seu teor no extrato e teor na biomassa. Para tanto, estimou-se que após o tempo reacional, adição de 1 mL de água e agitação em Vórtex, toda a fase inferior era composta pelo clorofórmio adicionado, isto é, 2 mL.

$$MF = C \left(\frac{mg}{L} \right) \times 2 (mL) \times \frac{1}{1000} \quad (22)$$

$$TFE = \left(\frac{MF}{TL} \right) \times 100 \quad (23)$$

$$TFB = \left(\frac{MF}{m} \right) \times 100 \quad (24)$$

Onde:

MF = Massa de FAME total extraída;

C = Concentração de FAME obtida a partir dos dados cromatográficos;
 TFE = Teor de FAME no extrato lipídico;
 TFB = Teor de FAME na biomassa;
 m = massa de biomassa AMAB seca e pulverizada utilizada na extração da amostra correspondente.

4.11.3. Análises de número de cetano e número de iodo

Dentre os parâmetros mais comumente utilizados na avaliação da qualidade do biodiesel, número de cetano (NC) e o valor de iodo (VI) figuram entre os dois principais dados a serem considerados. O NC varia de 0 a 100 e, quanto mais elevado, menor será o tempo entre a injeção do diesel e a combustão no interior do motor. Já o VI está associado à abundância de ligações duplas nas cadeias do biodiesel, o que faz com que este seja suscetível ao ataque de oxidantes, modificando suas propriedades no intervalo entre a refinaria e a bomba. Utilizou-se a metodologia de Wu e Miao (2014) para a determinação de ambos os valores a partir das seguintes equações empíricas.

$$SV_a = \sum_{x=1}^i \frac{560 \times TFE_x}{M_x} \quad (25)$$

$$VI_a = \sum_{x=1}^i \frac{254 \times D \times TFE_x}{M_x} \quad (26)$$

$$NC_a = 46,3 + \frac{5458}{SV} - (0,255 \times VI) \quad (27)$$

Onde:

VS_a = Valor de saponificação de uma amostra “a” qualquer;

i = Número de FAMES detectados na amostra “a”;

TFE_i = Teor do FAME “x” com relação ao extrato;

M_i = Massa molar do FAME “x”;

VI_a = Valor de iodo da amostra “a”;

D = Número de ligações duplas presentes na cadeia carbônica do FAME “x”;

NC_a = Número de cetano da amostra “a”.

4.10. VARIAÇÕES METEOROLÓGICAS

Tendo em vista que o sistema operado foi do tipo aberto, os perfis pluviométricos são importantes informações a serem coletadas. Dessa maneira, os dados foram obtidos a partir de repositório *on-line* da Agência Pernambucana de Água e Clima, optando-se pela escolha da estação Recife/Santo Amaro, administrada pela Coordenadoria de Defesa Civil de Pernambuco.

4.11. MÉTODOS GRÁFICOS E ESTATÍSTICOS

Para a elaboração dos fluxogramas e ilustrações, foram utilizados os softwares Microsoft Powerpoint® e Microsoft Paint® e o site *lucidapp.com*. Utilizou-se a modalidade paga do repositório *flaticon.com* para a obtenção de ilustrações vetorizadas. Os gráficos foram desenhados no software Originlab Pro®. Teste t de student e normalidade segundo Shapiro-wilk a 5% foram realizados com o software Jamovi.

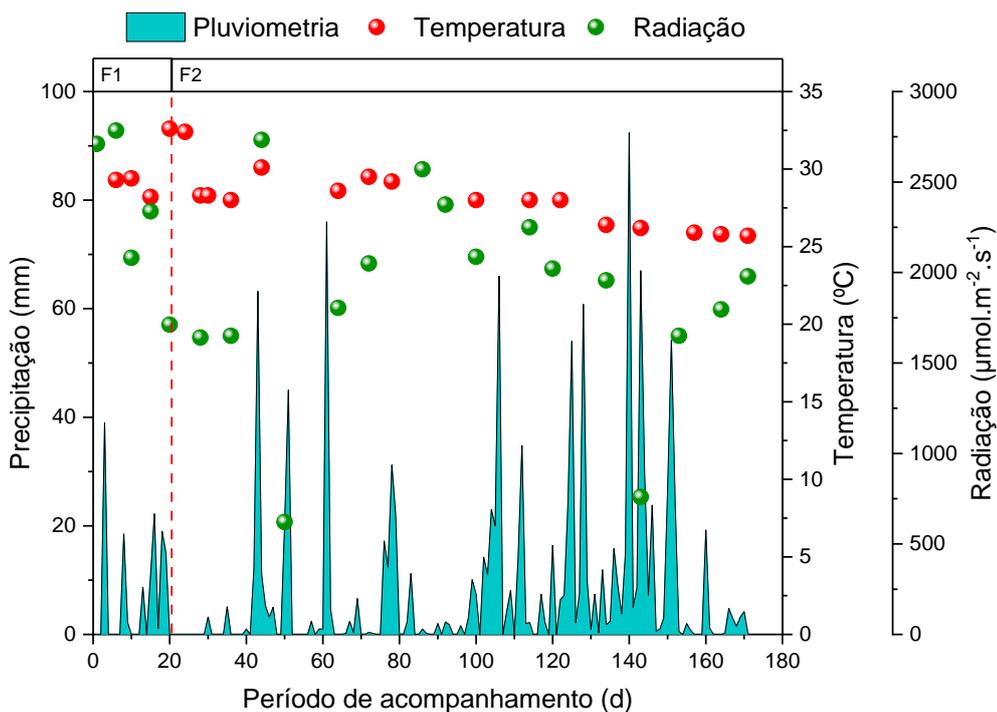
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos na pesquisa.

5.1. DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados referentes ao acompanhamento climático ao longo do estudo são apresentados na figura 16, abaixo. A incidência de chuvas foi obtida por meio da estação 16, mais próxima da ETE e com dados mais atualizados. A temperatura, medida no liquor misto da lagoa sempre às 9:00 da manhã, oscilou entre 25,7 e 32,6 °C. Segundo Rehman *et al.* (2022), embora a temperatura de crescimento algal seja específica para cada cepa, o intervalo entre 20 a 30 °C é conhecido por ser a faixa ótima. Por sua vez, o acumulado de chuvas ficou em 1383 mm, com presença de picos acima de 50 mm, caracterizando eventos extremos (Nóbrega; Farias; Santos, 2015). Chuvas extremas em dias específicos podem estar associados à diluição do cultivo da biomassa e carreamento das células de caráter mais plantônico.

Figura 16 - Perfil de precipitação, temperatura e radiação durante o experimento (Fev/2023 a Jul/2023), obtidos a partir de estação meteorológica e *in situ*.



Fonte: O Autor (2024).

Exceto 2 pontos, tomados em dias de chuva, a incidência de luz manteve-se acima de $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, típico valor diurno. Sistemas artificiais tipicamente operam entre 200 a $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Montemezzani; Van Wagenberg; Craggs, 2023; Rehman *et al.*, 2022). Considera-se, portanto, que o suprimento de radiação foi adequado.

Em suma, o suprimento de luz e radiação, essenciais à fotossíntese, foi considerado adequado ao longo do experimento, tornando o meio propício para o desenvolvimento da biomassa algal-bacteriana.

5.2. FASE 1 - FORMAÇÃO DOS AMAB

Os parâmetros de controle no início e fim da fase 1 se encontram descritos na tabela 9, abaixo.

Tabela 9 - Parâmetros de controle do esgoto afluyente e no início e final da Fase 1 do experimento.

Parâmetro	Unidade	Afluyente	Início (Dia 0)	Final (Dia 20)
pH	-	6,98	7,02	10,40
OD	mg.L ⁻¹	0,95	1,69	17,25
Condutividade	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	1001	898	601
Temperatura	°C	29,4	29,3	32,6
N-Amoniacal	mg.L ⁻¹	28,01 ± 0,06	19,56 ± 0,22	0,52 ± 0,01
N-Nitrito	mg.L ⁻¹	0	0,291 ± 0,029	0,845 ± 0,001
N-Nitrato	mg.L ⁻¹	0,237 ± 0,010	0,278 ± 0,145	4,988 ± 0,083
Fósforo total	mg.L ⁻¹	4,37 ± 0,19	4,37 ± 0,19	1,16 ± 0,08
DQO Bruta	mg.L ⁻¹	186,31 ± 39,33	401,18 ± 9,16	384,71 ± 29,43
DQO Solúvel	mg.L ⁻¹	75,50 ± 8,27	75,50 ± 8,27	27,70 ± 14,48
Alcalinidade Total	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	203,89 ± 5,91	184,63 ± 8,28	50,23 ± 5,80
Alcalinidade Parcial	mgCaCO ₃ .L ⁻¹	0	0	21,99 ± 1,48
SSV	mg.L ⁻¹	96,33 ± 21,87	279,33 ± 14,72	149,00 ± 25,07
Clorofila-a	mg.L ⁻¹	0,043 ± 0,019	0,044 ± 0,011	0,52 ± 0,13
C-a/SSV	mg.gSSV	0,15 ± 0,07	0,17 ± 0,04	3,46 ± 1,59
Eficiência de floculação	%	-	78,27	71,43
IVL30	mL.g ⁻¹	-	388,89	67,11
EPS prot	mg.g ⁻¹	-	30,38	17,71
EPS carb	mg.g ⁻¹	-	37,34	27,15

Fonte: O Autor (2024).

No início, o valor de pH de 6,98 é condizente com o tipo de efluente utilizado e se localiza em uma faixa adequada ao crescimento do fitoplâncton (Ihnken *et al.*, 2014;

Metcalf & Eddy, 2014). Após o período de 20 dias, é possível notar a elevação drástica do pH. Como já descrito, o processo fotossintético microalgal eleva o pH, apesar de possuir rotas distintas.

Além do observado no pH, o oxigênio dissolvido também se eleva a partir de um efluente notadamente anaeróbio. Cabe mencionar que para a temperatura de 32 °C, medida no dia 20, a saturação do oxigênio na água girou em torno de 7,28 mg.L⁻¹. Ou seja, a estratégia de inoculação gerou uma supersaturação de oxigênio em mais de 2 vezes, indicando a presença do desenvolvimento fotossintético.

A remoção de nitrogênio amoniacal observada na lagoa englobou uma série de fatores. Em primeiro lugar, no pH no dia 20, mais de 80% do nitrogênio amoniacal se encontrou na fase gasosa, facilitando sua liberação o que se considera um tipo de remoção empregada nas lagoas de alta taxa. Além disso, a incorporação do nitrogênio na biomassa deve ser considerada, apesar de haver um decréscimo nos sólidos suspensos voláteis, como será discutido adiante. Por último, notou-se a produção de aproximadamente 5 mg.L⁻¹ de nitrato, provavelmente fruto da atividade de bactérias nitrificantes que, em razão da abundância de oxigênio, não encontraram competição pelo acceptor de elétrons com as bactérias heterotróficas.

Associada à dinâmica observada na lagoa, a depleção de fósforo provavelmente se deu em razão da incorporação na biomassa e precipitação química. No pH elevado observado ao fim da fase 1, o fósforo forma precipitados insolúveis como fosfato de cálcio, fosfato de magnésio e estruvita (Su, 2021). A remoção de cátions por precipitação auxiliaria a explicar o decréscimo na condutividade do liquor misto da lagoa após o período de 20 dias.

Na ausência de dados de DBO, a remoção de DQO solúvel se associa em maior grau à remoção de matéria orgânica por parte das bactérias heterotróficas. Os dados revelam uma redução de 63,3% entre os dias 0 e 20. O valor foi considerado baixo quando comparado com outros estudos como Arcila e Buitrón, 2016; Sátiro, 2021), estudos que encontraram remoções na fase de adaptação acima de 80%. Esse dado sugere um estresse ocasionado pelo alto pH (10,27) no dia 20 que pode prejudicar microalgas e bactérias heterotróficas, causando baixas remoções de DQO.

Outros fatores que podem indicar um estresse causado pelo pH alcalino são os valores de EPS do tipo carboidrato e proteínas. De acordo com a tabela 10, observa-se um decréscimo entre o início da operação da lagoa e o término da fase 1.

Entretanto, os dados do dia 14 atingiram 57,87 e 94,69 mg/gSSV de EPS polissacarídeos e proteínas, respectivamente. Sabendo que o valor de pH no dia 14 atingiu 8,83, é possível supor que a elevação brusca a um patamar estressante para microalgas e bactérias pode ter prejudicado a biomassa a partir do dia 14.

Os dados de clorofila-a por grama de sólidos suspensos voláteis indicam uma participação microalgal na biomassa e, de forma semelhante aos dados de EPS, uma oscilação decrescente entre os dias 14 e 20, indo de 6,0 para 3,5 mg.gSSV⁻¹. Observa-se um claro crescimento da parcela fotossintetizante na biomassa quando se compara com o início do processo. Porém, considerando os valores de SSV de 133 e 149 mg.L⁻¹, para os dias 14 e 20, respectivamente, percebe-se um decaimento dessa parcela de fitoplâncton no período. De maneira análoga ao EPS, o efeito na clorofila-a corrobora o efeito deletério observado em razão da elevação brusca do valor de pH.

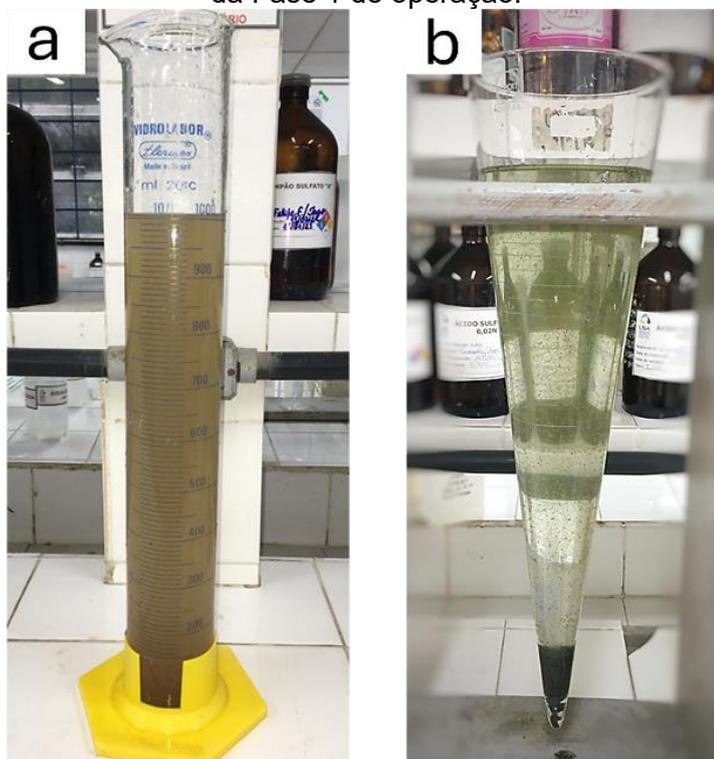
Os sólidos suspensos voláteis da lagoa, já mencionados, demonstram uma queda entre o valor inicial de 279 mg.L⁻¹ e o valor encontrado no dia 20, de 149 mg.L⁻¹. Essa queda já foi observada no estudo de Dos Santos Neto *et al.* (2021), pioneiro na demonstração da capacidade de formação da biomassa de AMAB a partir tão somente de lodo ativado e esgoto doméstico, não necessitando de inóculo algal. Entretanto, no estudo, o decréscimo se dá até o sétimo dia, a partir do qual a biomassa como um todo, medida em sólidos suspensos voláteis, passa a aumentar.

Os autores acima citados partem de um inóculo de 153 mg.L⁻¹, enquanto o trabalho de Sátiro (2021), na qual se baseou a presente pesquisa, partiu de um SSV total de 183 mg.L⁻¹ na fase mais efetiva de crescimento do AMAB no mesmo sistema de lagoas de alta taxa. Para garantir adequada quantidade de biomassa heterotrófica, optou-se por adicionar 180 mg.L⁻¹ de lodo ativado na lagoa, totalizando 279 mg.L⁻¹ ao incluir o esgoto. É possível supor que em sistemas de LAT com agregados microalga-bactéria, haja um decaimento natural da biomassa até valores entre 100 e 200 mg.L⁻¹, adequados à penetração de luz e desenvolvimento das espécies algais.

Como observado, o IVL30 assumiu valores excelentes, sabendo que uma biomassa considerada bem sedimentável possui IVL abaixo de 100 mL.g⁻¹. Entretanto, a eficiência de sedimentação foi abaixo do esperado, ficando em 71%. Visto que no dia 14 o valor se encontrava em 90,3%, isso pode se dever à associação crescimento de microalgas de vida livre e a possível degradação dos sólidos, efeitos

do alto pH e queda no EPS, gerando turbidez no sistema. Entretanto, como pode ser observado na figura 17, a biomassa apresentou boa sedimentabilidade.

Figura 17 - Liquor misto da lagoa após 30 minutos de sedimentação no início (a) e fim (b) da Fase 1 de operação.

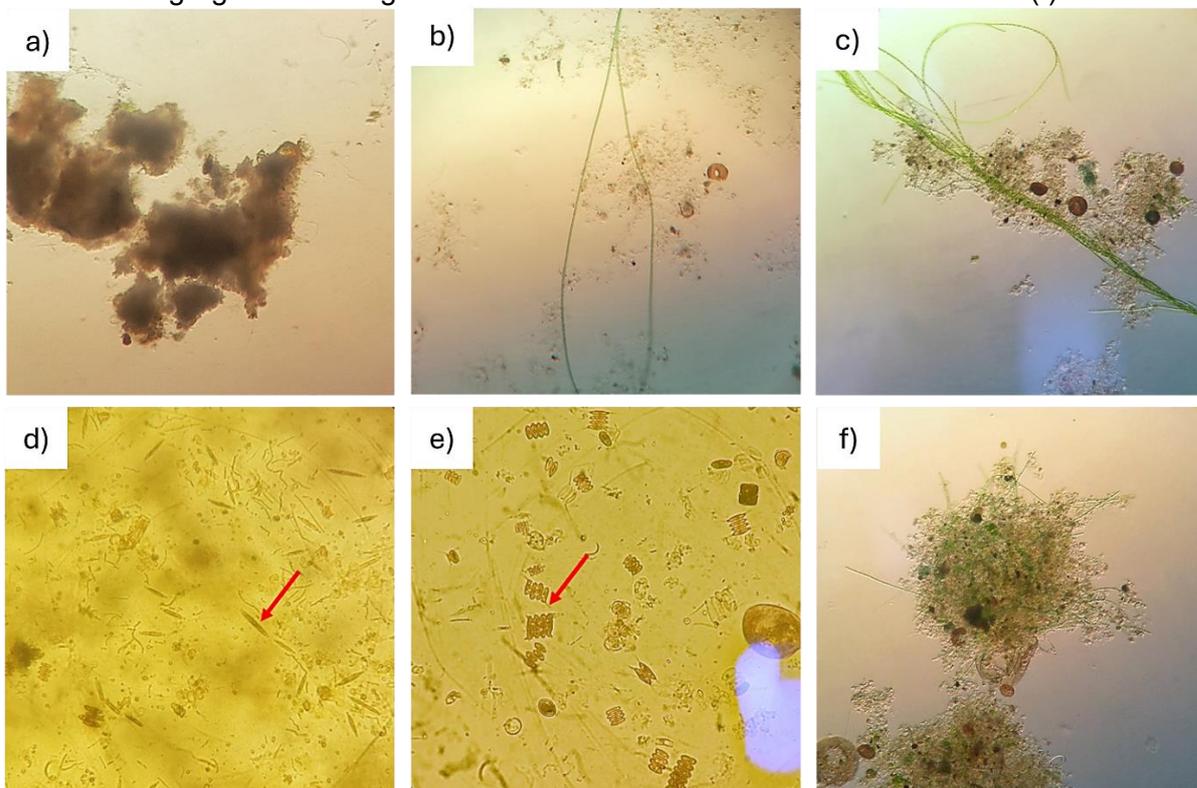


Fonte: O Autor (2024).

A considerável redução da alcalinidade ocorrida na fase 1 é outro indicativo da formação adequada de uma biomassa algal-bacteriana. Como já explicado, a absorção de carbono pode se dar a partir tanto de CO_2 como de bicarbonato. De acordo com a teoria química da análise de alcalinidade, nas condições do dia 0 e do efluente, toda a alcalinidade total é devida ao bicarbonato. No dia 20, por sua vez, a alcalinidade se divide em 6,25 e 43,98 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para bicarbonatos e carbonatos, respectivamente (APHA; AWWA; WEF, 2012). Claramente houve uma redução notável, indicando um crescimento algal satisfatório.

Em associação com os dados de sólidos, clorofila, EPS, nitrogênio, pH, OD e alcalinidade, o crescimento das microalgas é corroborado pelos registros microscópicos do acompanhamento da fase 1, encontrados na figura 18, abaixo.

Figura 18 - Registros microscópicos da Fase 1 de operação. Na ordem: Lodo ativado de inóculo (a); aparecimento (b) e desenvolvimento (c) das primeiras microalgas filamentosas, atuantes no suporte do floco; células de *Gomphonema* sp. (d) e *Desmodesmus* sp. (e); agregado microalga-bactéria bem desenvolvido ao final de 20 dias (f)



Fonte: O Autor (2024)

Como observado na figura 18a, a biomassa predominante na lagoa no início do período de adaptação se caracteriza por lodos floculentos. Após 5 dias, observou-se o crescimento de microalgas filamentosas, como as registradas nas figuras 18b e 18c. Já é razoavelmente conhecido que o suporte inicial do crescimento do agregado alga-bactéria se dá em função das filamentosas (Dos Santos Neto *et al.*, 2021).

Após 9 e 12 dias de início da Fase 1, já se nota um elevado aumento na complexidade do perfil algal, que vem a incluir *Gomphonema* sp. (Figura 19d) e grupos de 2 e 4 células de *Desmodesmus* sp. (Figura 18e). Após 20 dias, a biomassa apresentou visualmente agregados esféricos com microalgas filamentosas sustentando células de clorofíceas, em especial *Desmodesmus* sp., e biomassa que se supõe ser composta de EPS e bactérias heterotróficas. O registro desse tipo de estrutura pode ser encontrado na figura 18f.

Apesar da queda nos valores de clorofila-a, SSV e EPS, não se considerou que a biomassa sofreu danos irreversíveis. Além disso, os valores se encontraram em

faixas próximas às operadas em estudos prévios (Dos Santos Neto *et al.*, 2021; Sátiro, 2021). Em adição aos valores de pH e OD, os dados de IVL30 e microscópicos atestaram a formação de um agregado microalga-bactéria de propriedades satisfatórias, optando-se por dar seguimento à fase 2 de operação.

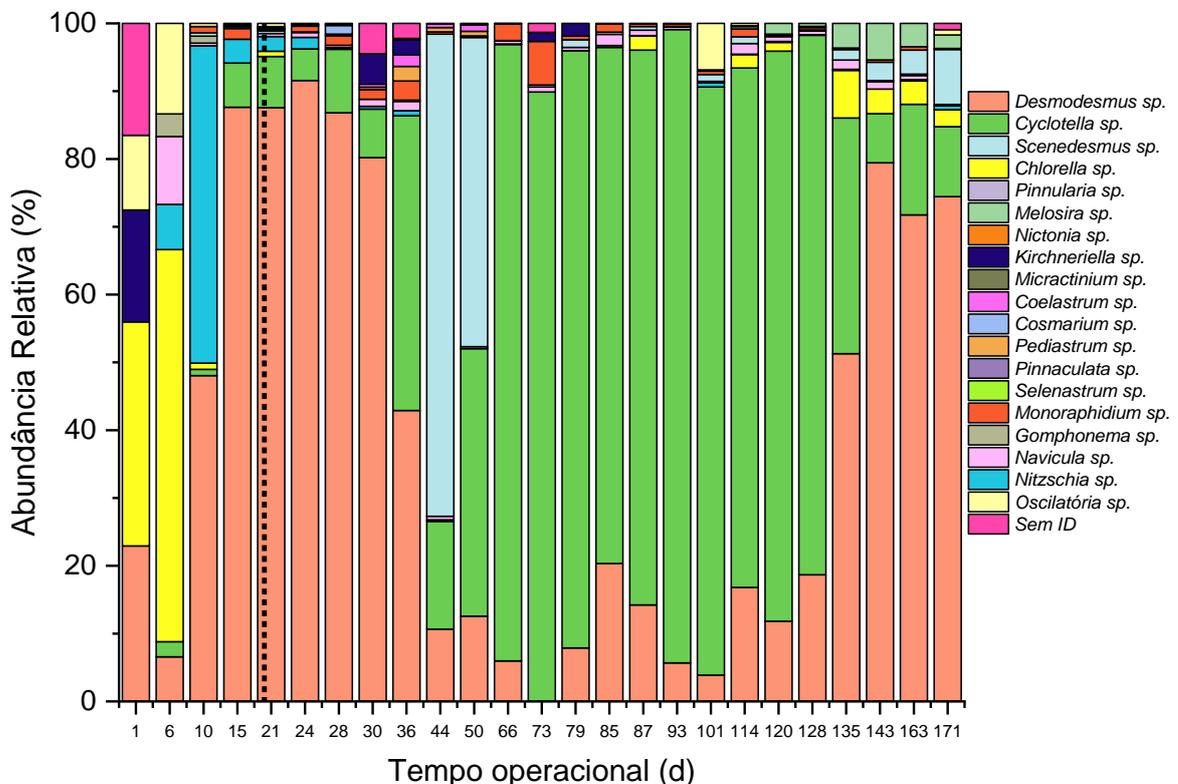
5.3. FASE 2 – OPERAÇÃO EM BATELADA SEQUENCIAL

Na seção adiante são apresentados os dados relativos ao acompanhamento da lagoa de alta taxa durante os 171 dias da fase 2.

5.2.1. Identificação e quantificação dos gêneros de microalgas

Na figura 19, são apresentados os dados de abundância relativa de gêneros de microalgas referentes às fases 1 e 2 do Experimento.

Figura 19 - Abundância relativa de gêneros algais ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.

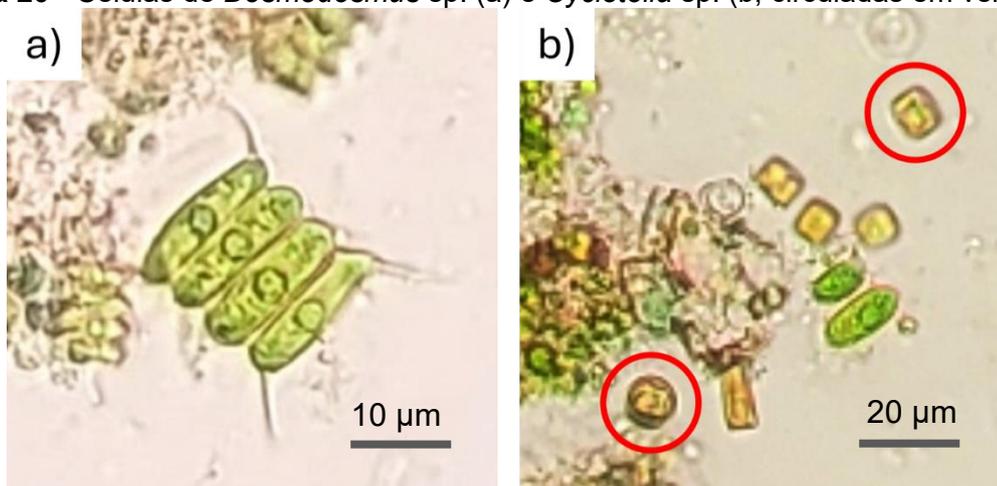


Fonte: O Autor (2024).

Como esperado, na fase 1 nota-se um perfil misto de microalgas que representa a surgimento dos primeiros gêneros. Apesar de possuírem elevados tamanhos, as filamentosas foram rapidamente superadas em número por um consórcio que culmina em uma predominância de quase 90% do gênero *Desmodesmus* sp., uma clorofíceia. Estudos apontam esse gênero como um colonizador comum de LATs nos cultivos com e sem adição de lodos ativados.

Após o início da operação em batelada sequencial, o gênero *Desmodesmus* sp. atingiu um pico de dominância e foi gradualmente substituído pelo gênero *Cyclotella* sp., uma diatomácea. À despeito de flutuações ocorridas nos períodos entre os dias 44 e 50, em que *Scenedesmus* sp. apresentou um rápido crescimento, *Cyclotella* sp. permaneceu entre os dias 66 e 128 exercendo dominância entre 80 e 90%. Esse período de predominância só é interrompido a partir do dia 135, no qual foi notado um ataque de zooplâncton na lagoa que será estudado em mais detalhes adiante. Na figura 20, são encontrados registros fotográficos de *Desmodesmus* sp. e *Cyclotella* sp. encontrados na lagoa.

Figura 20 - Células de *Desmodesmus* sp. (a) e *Cyclotella* sp. (b, circulado em vermelho).

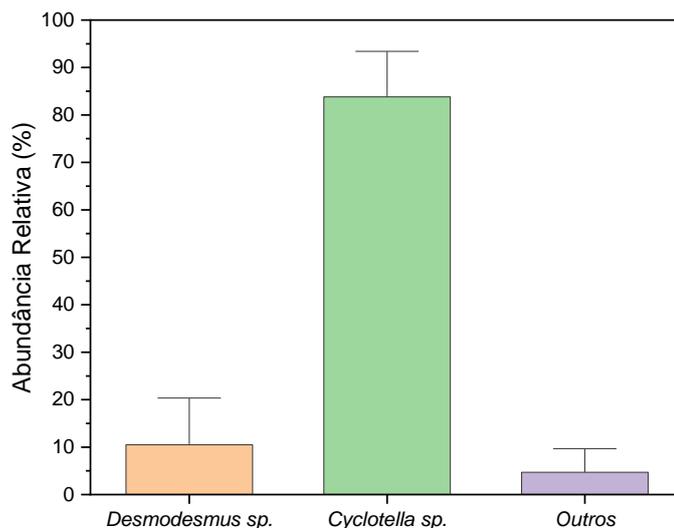


Fonte: O Autor (2024).

Em sistemas abertos, as variações de clima e temperatura e a inserção de espécies invasoras e predadoras dificultam a previsibilidade e produtividade, de tal maneira que a extração de compostos específicos é uma tarefa árdua. Por exemplo, ao cultivar AMAB no mesmo sistema da presente pesquisa mas sob regime contínuo, Sátiro (2021) obteve um máximo período de predominância de 15 dias para o gênero *Clorella* sp. Além disso, em um estudo em escala de bancada com e sem controle de

pH em LAT com AMAB, ao final de 69 dias, Dos Santos Neto (2021) não verificou nenhuma predominância significativa entre gêneros. O que se observa na figura 20 é não apenas um período de 60 dias de predominância de um gênero em específico, mas também uma previsibilidade no perfil algal, como observado na figura 21.

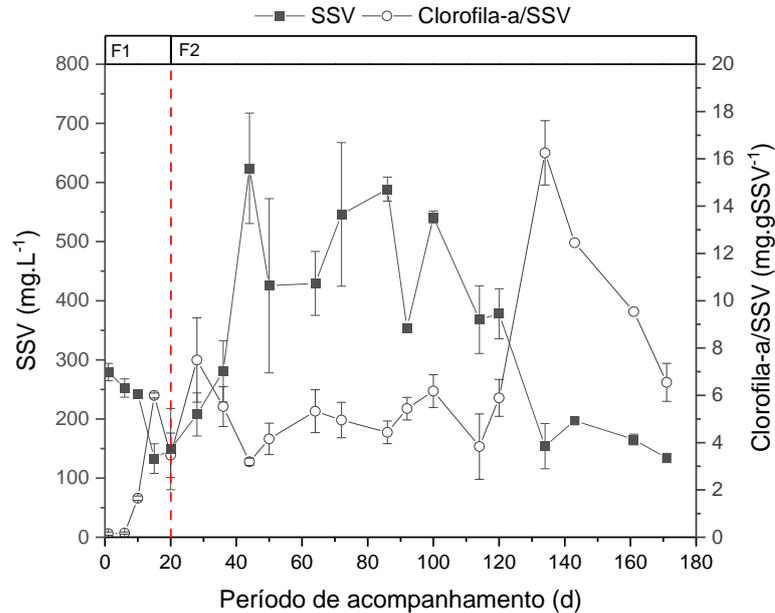
Figura 21 - Abundância relativa média dos gêneros algais dominantes no período dos dias 66 a 128.



Fonte: O Autor (2024).

A relação proporcional de microalgas é um fator que influenciará nas quantidades e tipos de subprodutos encontrados na biomassa. Entretanto, como se trata de um consórcio, a relação entre microalgas e bactérias também irá exercer influência, visto que a parcela bacteriana também contribui para aumentar ou reduzir o rendimento dos derivados algais. Como se observa na figura 22, a relação clorofila-a/SSV se mantém constante e não houve diferença estatística dos dias 20 a 66 e 66 a 128. Já nos dados de sólidos, houve uma diferença significativa dos dias 20 a 66 e 66 a 128, cabendo ressaltar que após isso a lagoa sofreu pastoreio por zooplânctons.

Figura 22 - Dados de Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e teor de clorofila-a por grama de SSV obtidos ao longo do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

A relação constante entre clorofila-a e SSV permite intuir uma contribuição equivalente das microalgas à biomassa. Junta-se a esse fator a proporção constante entre gêneros de algas e têm-se um cenário de notável previsibilidade em um sistema vulnerável como as lagoas de alta taxa.

Em adição, os dados de SSV revelam picos de produtividade logo após o início da fase em batelada sequencial, visto que se iniciou o aporte de nutrientes e matéria orgânica, escassos ao final da fase 1. No estudo já mencionado de Sátiro (2022), o mesmo sistema com igual altura e operando em regime contínuo foi capaz de acumular um máximo de 250 mg.L⁻¹ de SSV, valor consideravelmente inferior ao observado na presente pesquisa. Esse fator pode indicar que, de fato, a operação em batelada ofereceu melhores condições à manutenção de uma fase exponencial de crescimento, elevando a produtividade. Entretanto, é possível também que a operação em batelada tenha selecionado gêneros algais mais produtivos, hipótese que será discutida na seção 5.2.4.

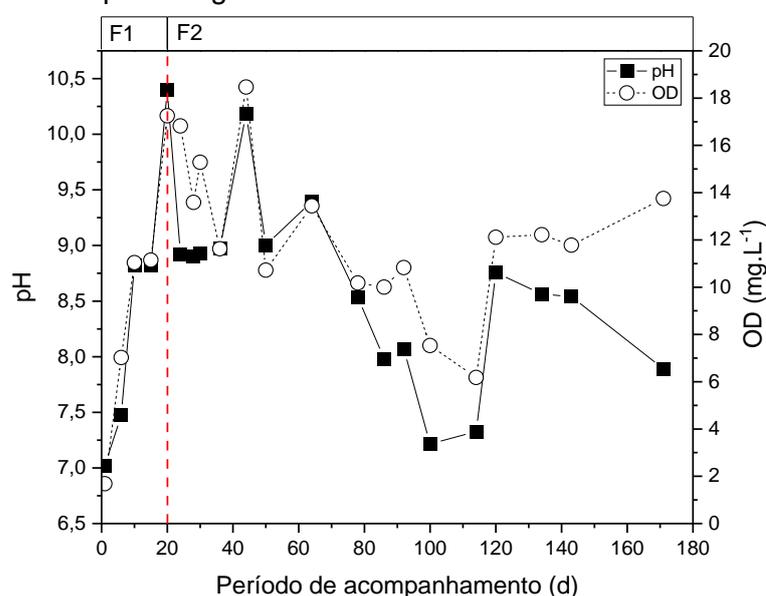
A produtividade média da Fase 2 até o dia 128 foi apontada em $30,57 \pm 8,16$ g.m⁻².d⁻¹, considerada alta para os padrões de lagoas de alta taxa, tendo em vista os valores de Sólidos Suspensos Totais (SST) de dos Santos (2023), quando foram

encontrados valores entre 16,5 e 30,7 g.m⁻².d⁻¹ em sistemas alga-bactéria de lagoas de alta taxa em escala piloto operando em regime contínuo.

5.2.2. pH, OD e pastoreio Zooplantônico

Na figura 23, encontram-se os dados relativos ao pH e oxigênio dissolvido (OD) da lagoa estudada nas Fases 1 e 2.

Figura 23 - Valor de pH e oxigênio dissolvido medidos in situ na LAT nas Fases 1 e 2.



Fonte: O Autor (2024).

Como já explicado, o valor do pH da lagoa se elevou ao longo da fase 1 em razão do crescimento dos micro-organismos fotossintéticos. Após o início da operação em batelada sequencial, notou-se um decaimento do pH e oxigênio dissolvido, acompanhado pela redução de *Desmodesmus* sp. na abundância relativa. Sabe-se que clorófitas possuem a clorofila-a como pigmento primário. Já diatomáceas, como *Cyclotella* sp. possuem a fucoxantina como principal pigmento fotossintético (Lee, 2018). É possível que fatores como esse tenham causado uma diminuição no valor de pH à medida que *Cyclotella* sp. foi sendo selecionada como gênero mais bem adaptado à operação em batelada sequencial.

Apesar da já discutida alcalinização fotossintética do meio estar associada a uma remoção de patógenos eficiente, também é causadora de baixas produtividades e estresse oxidativo nas células. Sistemas como lagoas de polimento podem fazer

bom uso, desse efeito. Mas sistemas que visam produzir bioderivados frequentemente precisam utilizar a adição de CO₂ a fim de suplementar o carbono inorgânico e reduzir o valor do pH (Daneshvar *et al.*, 2022).

Os dados encontrados aqui podem indicar que o regime hidrodinâmico usado não só foi capaz de produzir um perfil de biomassa previsível em microalgas e razão alga/bactéria. Também conseguiu esse desempenho em condições cada vez mais próximas da neutralidade, culminando nos dias 100 e 114, com valores de pH de 7,21 e 7,34, respectivamente, medidos às 10 horas da manhã, período de pleno pico fotossintético. Os mecanismos que podem ter levado à seleção dos gêneros e os resultados de pH serão mais bem discutidos no tópico 5.2.4.

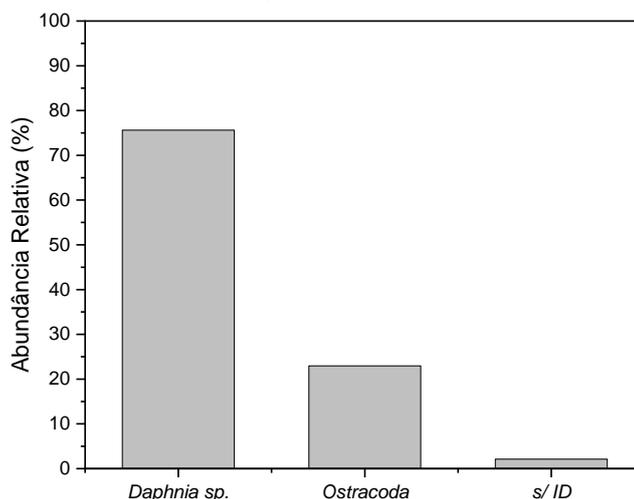
Após o dia 128, o ataque de zooplânctons na lagoa causou uma dramática mudança na biomassa e nos parâmetros da lagoa. Em primeiro lugar, notou-se uma drástica elevação tanto no valor de pH quanto no oxigênio dissolvido. Além disso, como observado na figura 22, os sólidos suspensos voláteis da lagoa decaíram significativamente, enquanto a razão clorofila-a/SSV aumentou. Ou seja, a parcela algal mais rica em clorofila-a cresceu em participação após o ataque de zooplâncton à medida que outra parte, menos rica ou ausente (no caso das bactérias heterotróficas) diminuiu.

Como já observado, *Desmodesmus* sp. foi o gênero rico em clorofila-a que melhor se adaptou às condições da lagoa, mesmo sob quantidades reduzidas frente à *Cyclotella* sp. Em pesquisas anteriores, o pastoreio por zooplânctons ocasionava uma redução global na parcela de contribuição fotossintética, isto é, o ataque não era direcionado (Dos Santos, 2023). Como observado na figura 20, as células de *Desmodesmus* sp. desenvolvem espículas nas células das extremidades dos grupos de 2, 4, 8 e 16 células. Associados a tamanhos celulares maiores, essas estruturas pontiagudas dificultaram a predação por zooplânctons como cladóceros, copépodes e outros.

Em contrapartida, células de *Cyclotella* sp. são pequenas e esféricas ou quadriculadas, tornando-se presas mais favoráveis à predação. Além disso, no período de dominância de *Cyclotella* sp., embora os valores de pH próximos da neutralidade que foram alcançados tornem o tratamento menos danoso à biomassa, também geraram um ambiente altamente propício ao crescimento de zooplânctons (Montemezzani *et al.*, 2015). De fato, após os dias de maior redução no valor de pH,

a presença de pastoreio foi detectada. No dia 135 foi notado a perda substancial da biomassa, realizando-se uma análise de perfil de zooplânctons cujo resultado encontra-se na figura 24.

Figura 24 - Perfil de gêneros de zooplânctons encontrados no dia 135 após o início do pastoreio.



Fonte: O Autor (2024).

Percebe-se que o principal agente de pastoreio das algas foram representantes do gênero *Daphnia sp.* Trata-se de integrantes do filo Cladocera, pequenos crustáceos de tamanho variando entre 0,2 mm e 5,0 mm. São predadores frequentes em lagoas de alta taxa e podem ingerir partículas de tamanho variando de 1 a 80 um. Já Ostracodes são predadores onívoros, capazes de se alimentar de microalgas, bactérias, detritos, entre outros (Montemezzani *et al.*, 2015). A associação entre os dois certamente foi capaz de reduzir a biomassa tanto algal quanto bacteriana.

Tendo em vista os dados de clorofila-a/SSV e microscopia, é possível concluir que o pastoreio teve como alvo preferencial as microalgas diatomáceas do gênero *Cylotella sp.*, menores e sem estruturas de defesa. Apesar da biomassa como um todo sofrer uma redução, a parcela de *Desmodesmus sp.* sobreviveu mais e foi capaz de contribuir no aumento da clorofila na biomassa e no pH e OD, como observado. Os mecanismos de elevação do pH por parte de *Desmodesmus sp.* serão discutidos na seção 5.2.4, adiante. Após o dano causado na biomassa pela proliferação do zooplâncton, a lagoa não mais se recuperou e exibiu um perfil de instabilidade, optando-se por encerrar o experimento no dia 171.

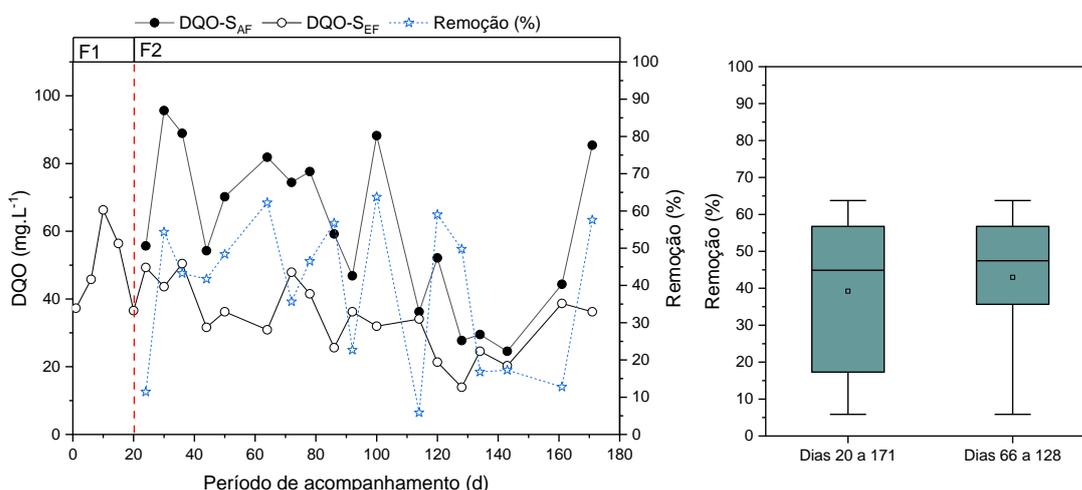
5.2.3. Desempenho do tratamento

Nesta seção são apresentados os resultados de remoção de nutrientes encontrados ao longo das Fases 1 e 2 da lagoa, o que incluiu Demanda Química de Oxigênio (DQO) solúvel, Fósforo Total e Nitrogênio nas formas amoniacal, total, nitritos e nitratos. Na fase de batelada sequencial, as remoções apresentadas estão atreladas à diferença de concentração entre o afluente (AF) e efluente (EF) da LAT no primeiro ciclo de batelada de cada semana.

5.2.3.1. Remoção de Carbono

Na ausência de dados de Demanda bioquímica de oxigênio, a medida de demanda química de oxigênio solúvel (DQO-S) pode ser um dos indicadores da remoção de matéria orgânica por parte do consórcio alga-bactéria. Na figura 25, são apresentados os dados de DQO solúvel para o afluente e efluente durante todo o período experimental.

Figura 25 - Perfil de remoção de DQO solúvel ao longo das Fases 1 e 2.



Fonte: O Autor (2024).

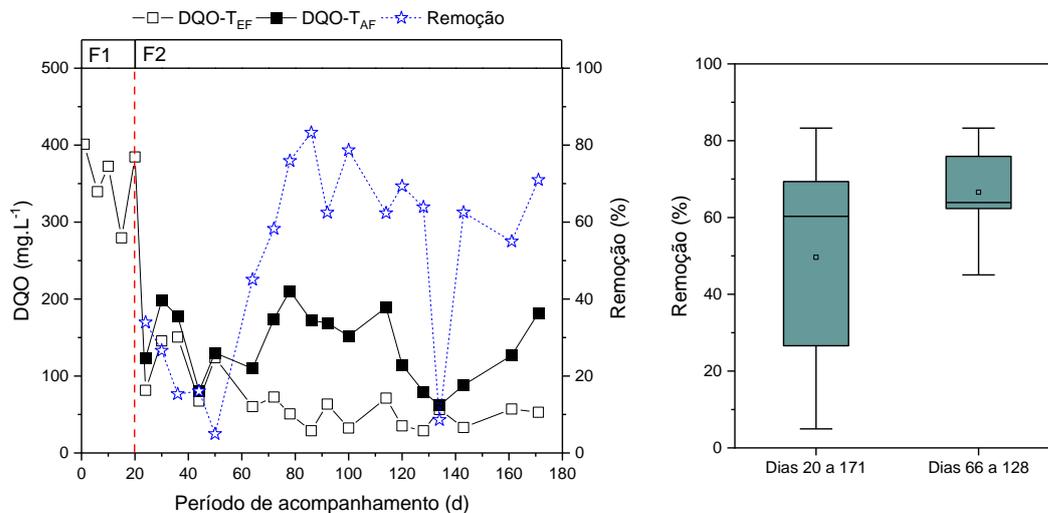
A Fase 2 de operação demonstrou um perfil de remoção de DQO oscilante, sem padrão claro e com desempenho consideravelmente menor que sistemas semelhantes. No estudo de Buitrón e Coronado-Apodaca (2022), o teste de 3 tempos de retenção de sólidos em LATs de escala de bancada e com agregados alga-bactéria,

resultou em uma remoção média DQO-S de $86,9 \pm 9,5 \%$. Verificando a diferença entre esgoto primário e secundário no desempenho de LATs em escala de bancada com AMAB, Biliari e Manariotis (2023) encontraram valores de remoção de DQO-S mínimos de $95,9 \pm 0,2\%$ com substrato semelhante ao deste estudo.

Entretanto, no estudo de Biliari e Manariotis (2023) foi utilizado um esgoto primário de DQO total de $205 \pm 10 \text{ mg.L}^{-1}$ e solúvel de $188 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$; enquanto o esgoto secundário teve DQO total de $54 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$ e DQO solúvel de 48 mg.L^{-1} . Adicionalmente, o efluente utilizado por Buitrón e Coronado-Apodaca (2022) foi passado em peneiras Tyler de Mesh 65, ou seja, 0,212 mm de diâmetro de poro. Portanto, nessas pesquisas há uma clara deficiência, em maior ou menor grau, de material particulado no substrato dos sistemas de lagoas, fator comum na operação em escala piloto e real. Vê-se, portanto, que a comparação de sistemas piloto com sistemas de bancada em termos de DQO solúvel pode ser enviesada.

Em sistemas contínuos, a remoção em termos de DQO total é costumeiramente descartada por englobar também a biomassa algal ou algal-bacteriana. Porém, a operação em batelada sequencial funciona como reator e sedimentador. Considerando, nesse caso, um sistema fechado de entrada e saída do líquido, o efluente que irá, em teoria, ser descartado na natureza será mais bem descrito por sua DQO total e o tratamento também deve levar em conta a remoção desta. Portanto, são apresentados na figura 26, dados de remoção de DQO total.

Figura 26 - Perfil de remoção de DQO total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

Neste caso, observa-se um claro período de mais elevada remoção de DQO total que se alinha com precisão ao intervalo de maior dominância de *Cyclotella* sp. sob a abundância relativa, o que vai do dia 66 a 128. Como já observado, embora não tenha havido diferença estatística relevante até o ataque de zooplâncton, foram encontrados também nesse período os maiores valores de sólidos suspensos voláteis. Portanto, durante esse período de dominância de *Cyclotella* sp., a lagoa encontrou seu melhor desempenho em termos de remoção de DQO total.

É provável que as células de *Desmodesmus* sp. tenham apresentado maior tendência à vida plantônica, enquanto *Cyclotella* sp. pode ter indicado preferência pela aderência nos flocos de AMAB. Assim, menos células foram descartadas no efluente, o que também pode ter otimizado o acúmulo de biomassa ativa na LAT. Além disso, bactérias e microalgas podem ter estabelecido relações mutualísticas mais eficazes de maneira a produzir em maior quantidade enzimas que degradam o material particulado, o que explicaria as remoções menos eficientes de DQO solúvel.

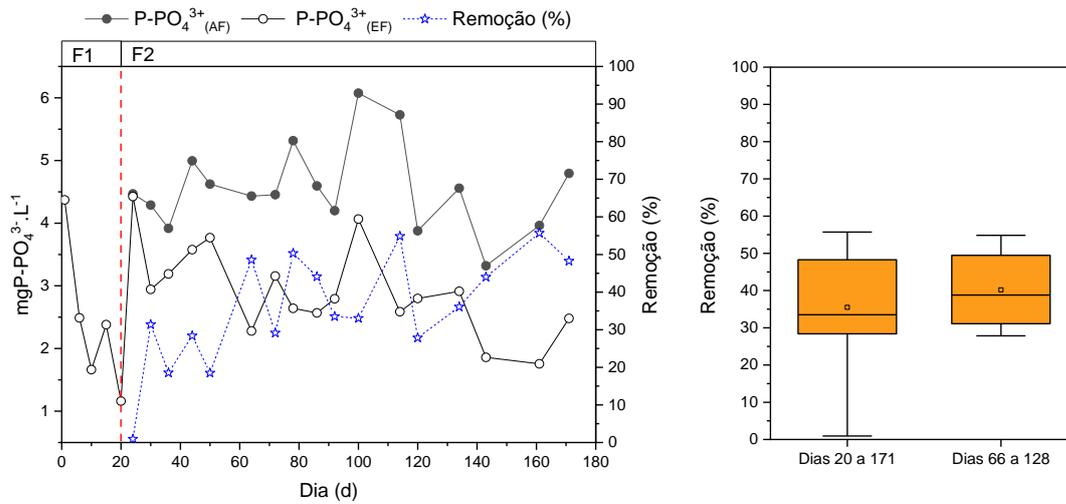
Entretanto, a partir do dia 135 a lagoa sofreu o já mencionado pastoreio por zooplânctons. Em ambos os dados das figuras 24 e 25, vê-se uma queda nesse dia, delimitando a perda de eficiência do sistema. Isso se deve, provavelmente, a uma degradação dos flocos AMAB por predação, seguido de liberação de moléculas solúveis de EPS, células livres e resíduos celulares.

No dia 142, o aumento da eficiência na remoção de DQO total deve ter acontecido em razão da atividade de *Desmodesmus* sp., sobrevivente principal do pastoreio. O gênero foi capaz de realizar fotossíntese e manter os níveis de oxigênio acima de 11 mg.L⁻¹, como apontado na figura 22, o que deve ter estimulado o crescimento de bactérias heterotróficas e elevado a remoção de matéria orgânica. Além disso, essa atividade fotossintética elevou o pH acima de 10, o que pode ter sido o suficiente para estimular a autofloculação da biomassa, induzindo uma maior remoção de particulados do efluente após a etapa de sedimentação.

5.2.3.2. Remoção de Fósforo

Os dados de fósforo total englobam fosfatos dissolvidos e materiais fosfatados particulados ou coloidais no meio. Adiante, são apresentados os resultados para o acompanhamento deste parâmetro ao longo das fases 1 e 2.

Figura 27 - Perfil de remoção de fósforo total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

As eficiências de remoção do dia 20 ao dia 50 e do dia 66 ao dia 128 demonstraram diferença estatística significativa e médias de $19,5 \pm 10,43$ % e $40,1 \pm 7,31$ mg.L⁻¹. Portanto, novamente se vê uma elevação no desempenho atrelada ao período de estabilidade na biomassa. Apesar de ainda baixas com relação a outros trabalhos em lagoas de alta taxa, o tratamento durante os dias 66 e 128 encontrou os valores de pH mais próximos da neutralidade.

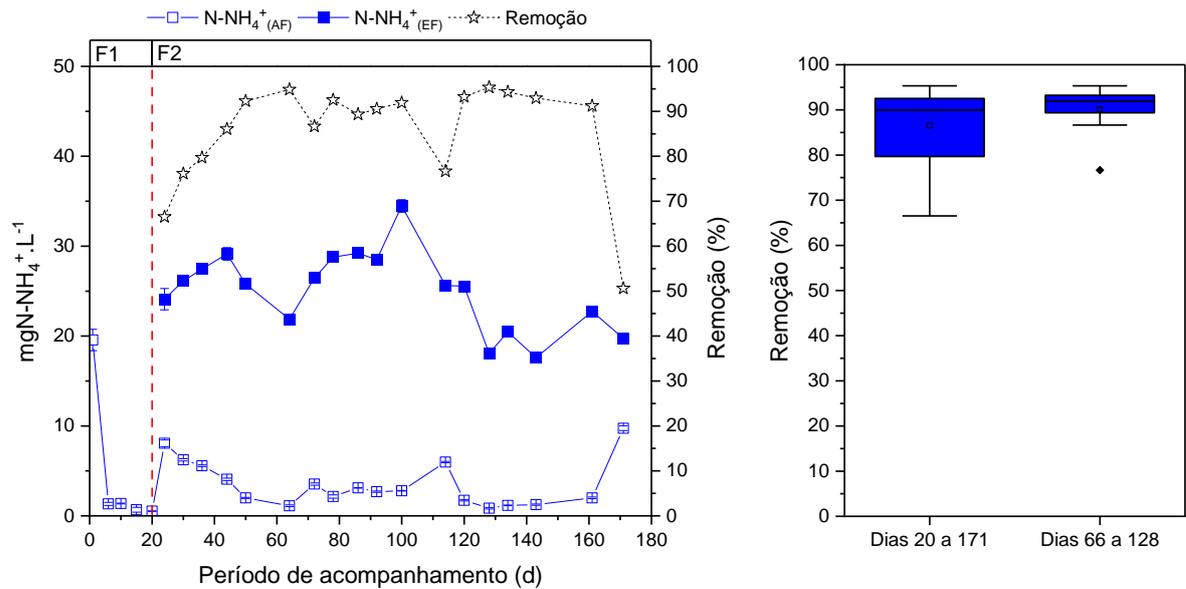
Como se sabe, a remoção de fósforo em sistemas alga-bactéria em grande parte se dá por precipitação química em altos valores de pH. Embora seja eficiente do ponto de vista do tratamento, a biomassa é deixada em segundo plano quanto ao acúmulo do nutriente, dificultando seu reuso em aplicações agrícolas. No presente estudo, os tratamentos mais eficientes se deram sob pH que foram de 7,3 a 9,0, o que indica a rota de assimilação na biomassa como mecanismo principal.

Após o dia 135, a biomassa sofre com o pastoreio, mas não apresentou diferença estatística na remoção de fósforo total, alcançando um valor de $46,10 \pm 8,01$ mg.L⁻¹. Embora haja a perda de biomassa, o processo fotossintético encabeçado por *Desmodesmus* sp. manteve o pH em valores acima de 10, favorecendo a precipitação química do fósforo. Portanto, a remoção se manteve semelhante por um mecanismo distinto do observado no período dos dias 66 a 128.

5.2.3.3. Remoção de Nitrogênio

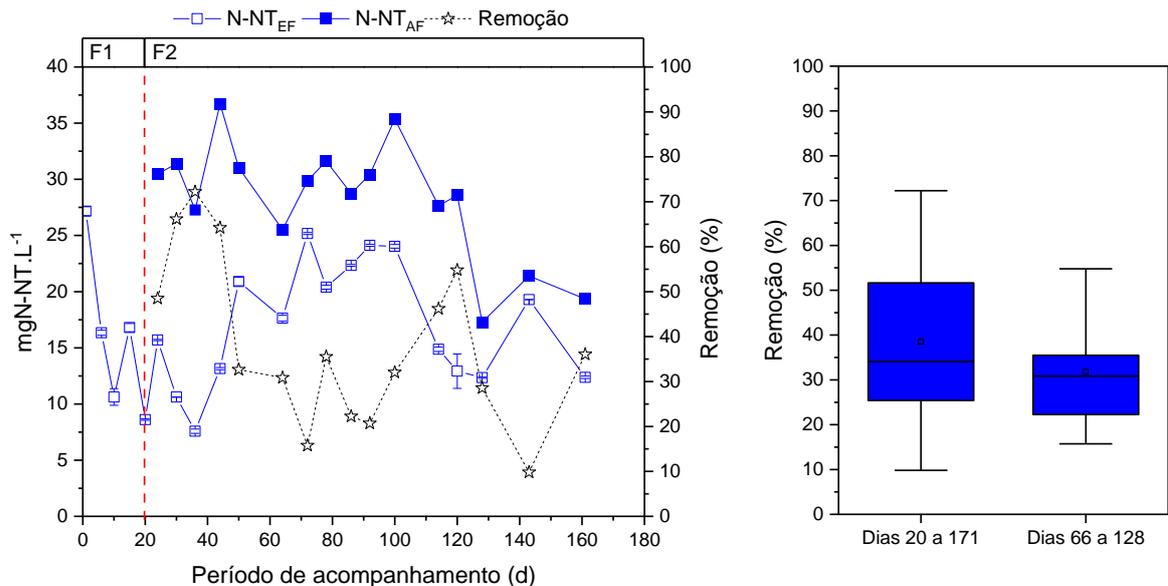
Os dados de remoção de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+) e nitrogênio total (N-NT) se encontram descritos nas figuras 28 e 29, abaixo.

Figura 28 - Perfil de remoção de nitrogênio amoniacal ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

Figura 29 - Perfil de remoção de nitrogênio total ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.



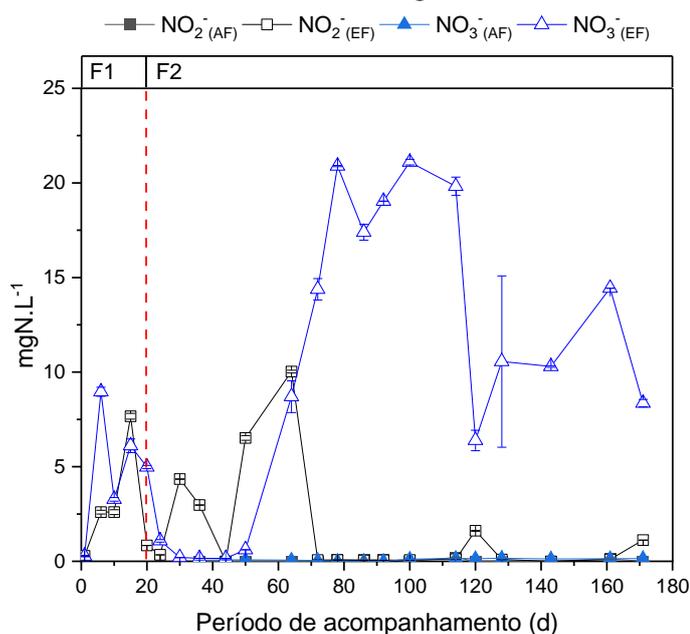
Fonte: O Autor (2024).

Após o início da Fase 2, as remoções de nitrogênio amoniacal progressivamente se elevam, até atingir patamares ao redor de 90% na faixa dos dias de predominância de *Cyclotella* sp. Cabe mencionar que o dia 114 se apresentou como *outlier* por conta de quedas de energia na estação de esgoto, o que causou a parada da rotação da hélice por algumas horas.

Dos Santos Neto *et al.* (2021), por exemplo, alcançaram remoções de nitrogênio amoniacal de 83% em LAT-AMAB de bancada com recirculação de sólidos e fluxo contínuo. Em um sistema semelhante, Biliari e Manariotis (2023) obtiveram remoções de $87,6 \pm 11,5$ % sob o menor tempo de detenção hidráulica de 5,5 dias. Verificando o efeito da razão de inóculo de microalgas em fotobiorreatores AMAB tubulares, Sátiro *et al.* (2022) obteve 86,81% de remoção de $N-NH_4^+$. Portanto, considerando que o presente sistema é de escala piloto e do tipo aberto, as remoções desse nutriente foram satisfatórias.

Por outro lado, a análise do perfil de remoção do nitrogênio total revelou baixas eficiências, em especial nos dias 66 a 128, não excedendo 55%. Visto que o nitrogênio total considera não só o Nitrogênio total de Kjeldahl, mas também as espécies nitrito e nitrato, é preciso analisar as concentrações desses íons para melhor entender como elas refletiram no comportamento de remoção de NT. Os dados de íons nitrito e nitrato se encontram na figura 30.

Figura 30 - Perfil de nitritos de nitratos ao longo das Fases 1 e 2 do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

Na primeira fase, já se observou a elevação dos níveis de ambos os íons, provavelmente decorrente da escassez de matéria orgânica biodegradável no sistema durante a batelada única. Os níveis de nitrato voltam a decair pouco antes do dia 20 e se mantêm baixos, até o dia 66 da Fase 2. Após isso, é possível notar que houve um acúmulo de íons nitrato, do dia 66 a 128. O nitrito por sua vez, aparece em picos, entre os dias 20 e 38 e 42 e 66.

Até o dia 66, o gênero algal predominante era *Desmodesmus* sp. Em um estudo de Xie *et al.* (2017), a produtividade da variedade *Desmodesmus* sp. F51 sob diferentes formas de nitrogênio e suplementação de carbono inorgânico foi avaliada. Os autores verificaram que o cultivo com íon nitrato e adição de 2,5% de CO₂ só apresentou eficiência inferior aos cultivos com íon amônio com 2,5% de CO₂ e bicarbonato e íon amônio com 2,5% de CO₂ e controle de pH. Além disso, o mesmo tratamento com NO₄⁻+CO₂ demonstrou superioridade ao tratamento NH₄⁺+CO₂.

Esses resultados podem indicar que *Desmodesmus* sp. tem uma capacidade acima da média de consumir nitrato como forma de nitrogênio, chegando mesmo a ser a forma preferencial, a depender das situações. Isso poderia explicar a razão da queda do nitrato a partir do dia 14, sendo observada sua elevação apenas a partir do dia 66, quando *Cyclotella* sp. passa a ser a microalga dominante. Em adição, após o ataque de zooplâncton os níveis de nitrato voltam a cair, enquanto *Desmodesmus* sp. volta a assumir dominância em razão do pastoreio direcionado.

A presença de picos de nitrito e a grande fase de acúmulo de nitrato dos dias 66 a 128 indica que pode ter havido altos índices de nitrificação na lagoa. Para investigar essa hipótese, parte-se do estudo de Soroosh, Otterpohl e Hanelt (2023) que, por meio de cálculos estequiométricos, apontaram que a biomassa de AMAB em atividade balanceada necessita de 15,94 mg de DQO biodegradável para eliminar 1 mg de N-NH₄⁺. Em baixas C/N o metabolismo mais lento das nitrificantes se sobressai e a sua quantidade pode ser 10 vezes maior (Sepehri; Sarrafzadeh, 2018).

Durante toda a Fase 2, a razão DQO/N-NH₄⁺ foi de 5,62 ± 0,75, considerada baixa, o que deve ter induzido um meio favorável à atividade das bactérias nitrificantes. Esse fator colabora para a explicação das baixas remoções de matéria orgânica, visto que o oxigênio, sobretudo nos dias 66 e 128, deve ter sido em parte utilizado para oxidar NH₄⁺ a NO₃⁻. Tal fato leva a crer que a remoção de nitrogênio amoniacal até o dia 135, foi fruto da atividade de nitrificantes e microalgas.

Mais do que isso, a competição por $N-NH_4^+$ pode induzir a fase lag na biomassa de AMAB, o que pode ter causado a estabilização nos dados de Clorofila-a e sólidos suspensos voláteis durante o período dos dias 66 a 128. Outro fator importante são os altos níveis de sólidos, como observado na figura 22, que tendem reduzir a penetração de luz na lagoa, tornando o meio ainda mais favorável às bactérias nitrificantes (Soroosh; Otterpohl; Hanelt, 2023).

Após o ataque de zooplâncton a lagoa apresentou remoção de nitrogênio amoniacal acima de 90%, o que se deu em razão da elevação fotossintética do pH originada pela maior participação de *Desmodesmus* sp. na biomassa. Apesar da perda de biomassa na forma de SSV, incluindo nitrificantes e *Cyclotella* sp., altos pH são capazes de induzir a volatilização da amônia, mantendo a eficiência de remoção alta até o último ponto onde o declínio da biomassa tornou-se insustentável.

5.2.4. Dinâmica de sucessão ecológica

Como já observado, o sistema apresentou uma interessante estabilidade a nível de gêneros algais, razão clorofila-a/SSV e remoção de nitrogênio amoniacal, total e DQO total. Além disso, foi durante o período dos dias 66 e 128 que se encontrou uma tendência à neutralidade do pH do meio, eliminando problemas como o estresse oxidativo e queda na produtividade. Esse resultado, que engloba mais de 60 dias, se deu em um sistema aberto, que além de ser sujeito à entrada de chuvas, ventos, poeiras, folhas, insetos e pássaros, se encontra vulnerável à sazonalidade de temperaturas e iluminação. Portanto, o efeito ocorrido na lagoa durante todo o processo e, em especial, nos dias 66 a 128, é tema desta seção.

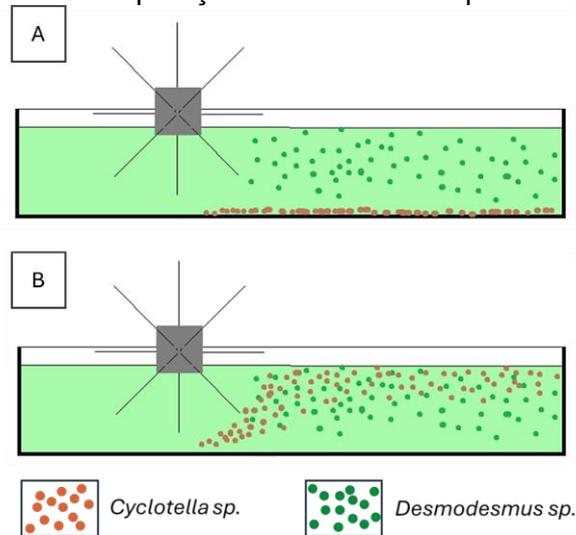
Em primeiro lugar, o pH médio do esgoto afluente, de aproximadamente 7,02, mantém o equilíbrio do CO_2 em condições de uma maior presença de bicarbonatos (Colman *et al.*, 2002). Em um estudo das formas de captura fotossintética do carbono inorgânico (CI), Colman e Rotatore (1995) demonstraram que o gênero *Cyclotella* sp. apresenta atividade intracelular da enzima Carbono Anidrase, indicando uma assimilação ativa de CI na forma de bicarbonato. Ou seja, por meio do mecanismo de concentração de carbono, *Cyclotella* sp. pode transportar HCO_3^- para o interior da célula, onde a CA realiza a reação 12.

Por outro lado, Xie *et al.* (2017) realizaram o cultivo de *Desmodesmus* sp. sob diferentes formas de nitrogênio e carbono e verificaram a elevada superioridade da suplementação com CO₂, chegando a produtividades de 1,1 g.L⁻¹. No estudo, o uso de bicarbonato de sódio e cloreto de amônio resultaram em apenas 0,1 g.L⁻¹ de biomassa algal. Como em outros gêneros, é possível que *Desmodesmus* sp. possua uma capacidade ativa e preferencial de assimilação de Cl na forma de CO₂. Além disso, em uma grande revisão de 60 anos de pesquisas, 317 artigos científicos e 35 gêneros algais, Granata (2017) concluiu que microalgas diatomáceas, incluindo *Cyclotella* sp., possuem taxas de crescimento superiores às clorofíceas em todos os casos, constatação em concordância com Williams e Laurens (2010).

Deve-se mencionar também que em cada início de batelada, o que ocorreu em dias alternados durante a operação na Fase 2, era feita uma mistura ativa na lagoa, o que incluiu a agitação da pá em velocidade máxima e raspagem suave dos flocos AMAB mais distantes da hélice. É possível supor que essa mistura ativa causou a suspensão de microalgas mais sedimentáveis, como *Cyclotella* sp. em razão de sua parede celular rica em sílica (Jimoh; Keshinro; Cowan, 2019).

O acesso à luz já mostrou ser essencial à assimilação de bicarbonato por *Cyclotella* sp., e a homogeneização induzida supriu esse requisito, permitindo que as maiores taxas de crescimento já reportadas fossem efetivadas. Operando o mesmo sistema da presente pesquisa em semelhantes condições, Sátiro (2020) verificou baixa presença de diatomáceas, o que pode indicar que em sistemas contínuos em escala piloto, a baixa movimentação global do líquido é um fator de seleção da biomassa. Cabe ressaltar que, nesses sistemas, a massa líquida não sofre variações bruscas de volume seguidas de efetiva homogeneização, como o que ocorreu com a presente LAT em estudo. Na figura 31, segue um esquema comparativo das diferenças de operação entre sistemas contínuos e em batelada sequencial.

Figura 31 - Suposição do comportamento de lagoas de alta taxa perante microalgas com tipos diferentes de sedimentabilidade: (A) Operação em regime contínuo; (B) Início de cada ciclo de operação em Batelada sequencial.



Fonte: O Autor (2024).

Como resultado, o MCC intracelular de *Cyclotella sp.* pode induzir as reações 10 e 11 para o lado direito por retirada do bicarbonato do meio, o que tende mudar o pH no sentido da acidificação. Além desse fator, a baixa razão carbono nitrogênio notadamente favoreceu as bactérias que realizam a nitrificação, reação consumidora de alcalinidade (Soroosh; Otterpohl; Hanelt, 2023). Outros autores como Perez-Garcia *et al.* (2011) mencionam também que o consumo de nitrogênio amoniacal por microalgas é capaz de reduzir o pH do meio, embora essa acidificação por si só não seja capaz de balancear a alcalinização produzida pela fotossíntese (Xie *et al.*, 2017).

Embora, como já mostrado no estudo de Xie *et al.* (2017), *Desmodesmus sp.* demonstre elevada produtividade ao usar nitrato como forma de nitrogênio, a baixa eficiência da heterotrofia no sistema pode ter reduzido a concentração disponível de CO₂, forma de CID preferencial. Em outras palavras, apesar dos altos níveis de nitrato, a limitação da forma de carbono biodisponível e a competição por nutrientes e luz com microalgas de produtividade mais eficiente devem ter mantido a abundância de *Desmodesmus sp.* sob controle durante os dias 66 a 128.

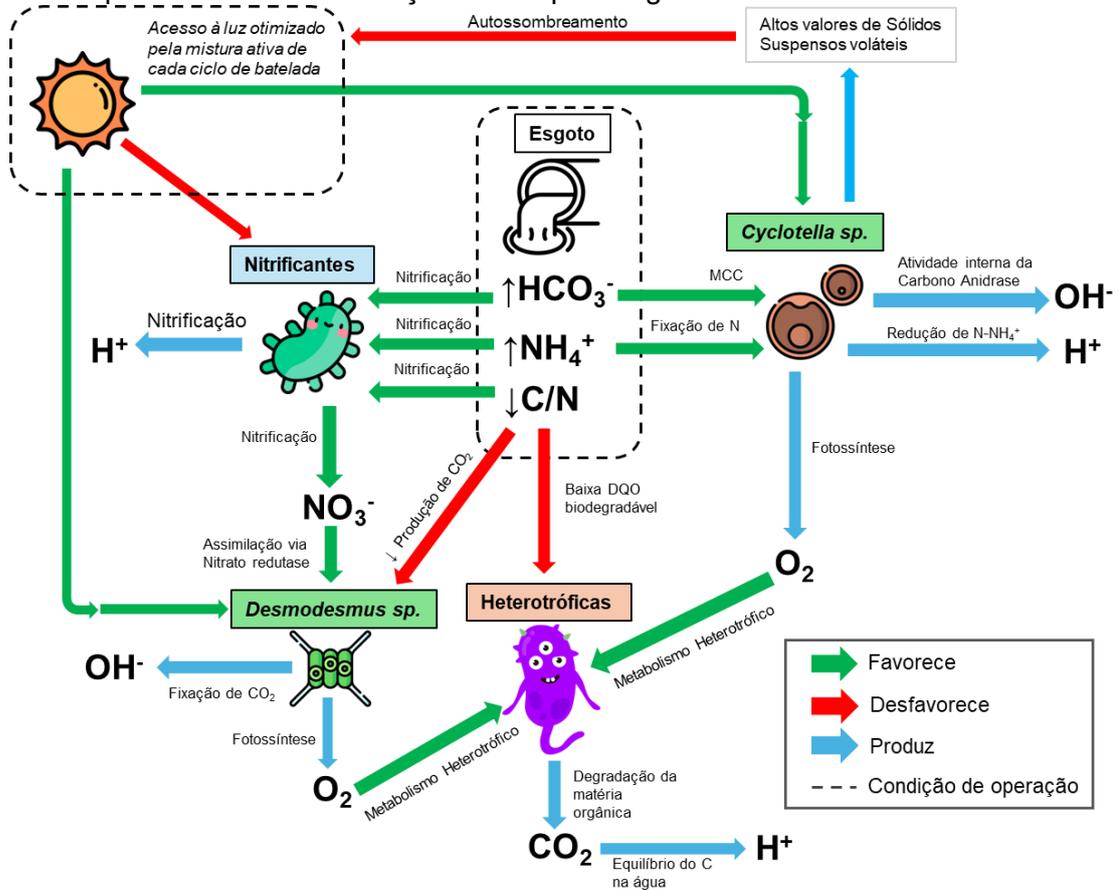
Portanto, esse período pode ter visto uma redução no pH em razão da oposição entre a atividade interna da CA nas células de *Cyclotella sp.*, atividade das nitrificantes e assimilação algal de amônio contra o metabolismo fotossintético de *Desmodesmus sp.*, esta em menor número. O equilíbrio foi mantido graças às constantes misturas

ativas até o ataque de zooplâncton. Como já demonstrado, o pastoreio foi direcionado preferencialmente à *Cyclotella* sp. e, em um menor nível, à biomassa como um todo.

Diante da falta de competidores, *Desmodesmus* sp. pôde ter um acesso mais facilitado à luz e nutrientes e a biomassa assumiu um perfil consumidor preferencial de CO₂. Visto que o mecanismo de concentração de carbono de clorófitas é capaz de acumular até 180 vezes a quantidade de carbono do meio externo (Singh; Sundaram; Kishor, 2014), é de se supor que a reação química $\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{OH}^-$ foi vigorosamente induzida para o lado direito, provocando a hidrólise do bicarbonato proveniente do esgoto. Presume-se que, após o ataque de zooplâncton, o meio só não atingiu valores de pH próximos de 11 em razão da atividade das bactérias nitrificantes.

Na figura 32, é apresentado um esquema das interações propostas para o sistema.

Figura 32 - Proposição das interações ocorridas na LAT operada em batelada sequencial e que levaram à manutenção de um perfil algal constante do dia 66 a 128.



Fonte: O Autor (2024).

Portanto, os principais fatores indutivos de uma biomassa previsível e um tratamento próximo da neutralidade foram a agitação em cada ciclo de batelada e as condições nutricionais do esgoto afluente. Embora seja um resultado promissor, as eficiências de remoção de matéria orgânica foram insatisfatórias, houve acúmulo de nitrato e a biomassa tornou-se vulnerável a um ataque de zooplânctons. Além disso, pode ter havido competição por nitrogênio amoniacal com as bactérias nitrificantes.

O primeiro passo de melhoria possivelmente seria a elevação da razão C/N, atrelada a um tratamento anaeróbio neste caso. É possível pensar em sistemas de tratamento semelhantes ao sistema único de crescimento de lodo, que divide o esgoto afluente da estação para a realização da oxidação heterotrófica e nitrificação (Metcalf & Eddy, 2014). Assim, a junção de parte do esgoto bruto com o esgoto pós-UASB poderia elevar a razão C/N, permitindo uma produção mais relevante de CO₂.

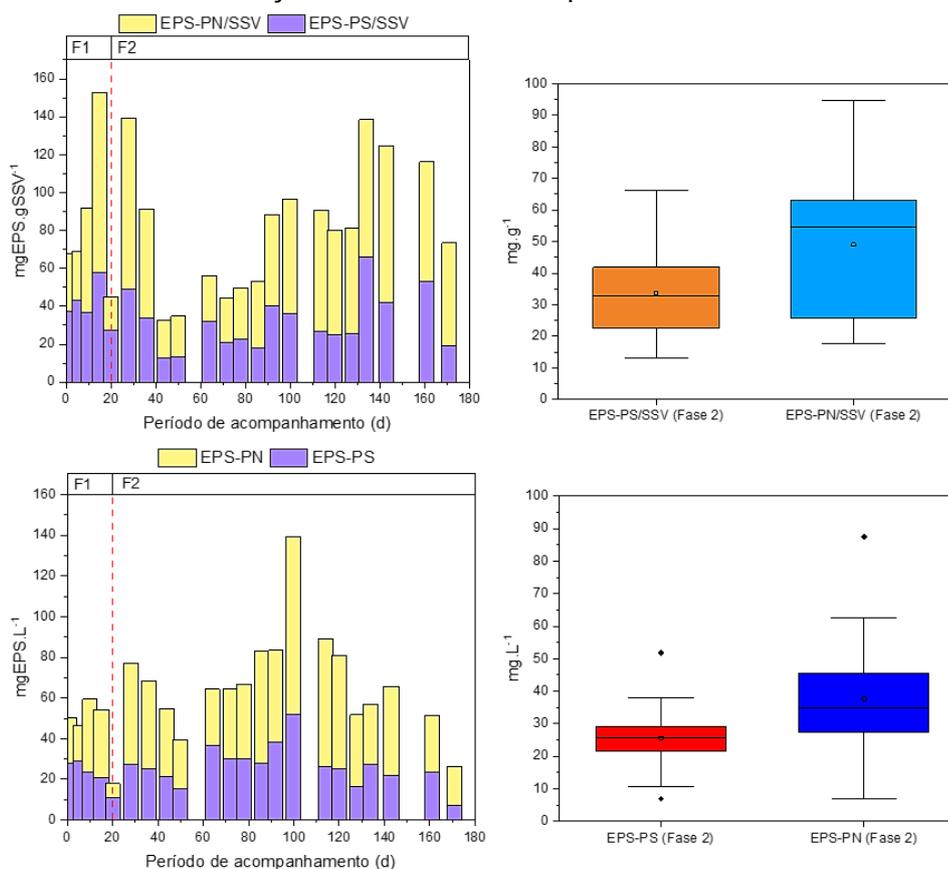
A elevação da matéria orgânica no esgoto de alimentação da lagoa também auxiliaria na redução da nitrificação. Se a remoção de fósforo e nitrogênio se desse em valores de pH menores e sem a interferência da nitrificação, o sistema encontraria um delineamento ideal para a recuperação dos nutrientes na biomassa. Uma outra possibilidade seria o uso de duas lagoas de alta taxa em série sob operação em batelada sequencial. O efluente clarificado da primeira lagoa conteria microalgas em suspensão de maneira que o nitrato como única forma de nitrogênio disponível.

O combate ao zooplâncton é uma atividade difícil que ainda não encontrou solução definitiva. Níveis altos de nitrogênio amoniacal são tóxicos para muitos tipos, mas os aportes do equivalente a 50% da lagoa em esgoto pós-UASB rico em N-NH₄⁺ não pareceram induzir uma resistência relevante. É possível que a redução momentânea para um TDH de 2 ou 1 dia durante alguns ciclos, quando verificado o início do pastoreio, possa lavar e intoxicar os predadores (Montemezzani *et al.*, 2015).

5.2.5. Material Polimérico Extracelular (EPS)

Na figura 33, adiante, são apresentados os dados de EPS em concentração no liquor misto da lagoa após a extração e o quociente com a biomassa total, medida pelos sólidos suspensos voláteis.

Figura 33 - Perfil do EPS tipo polissacarídeos e proteínas e seus respectivos quocientes com relação aos valores correspondentes de SSV.



Fonte: O Autor (2024).

Apesar dos dias 66 a 128 apresentarem menores concentrações relativas à biomassa, vê-se que este é o período em que há uma maior consistência de altas concentrações de EPS. Esse fenômeno se dá em razão das altas concentrações de sólidos ocorridas ao longo do período de predominância de *Cyclotella* sp. Assim, mesmo mais elevadas em valor absoluto, as concentrações de EPS relativas à biomassa se mostram reduzidas. A combinação desses dois fatores deve ser avaliada concretamente com base em valores de sedimentabilidade, apresentados adiante.

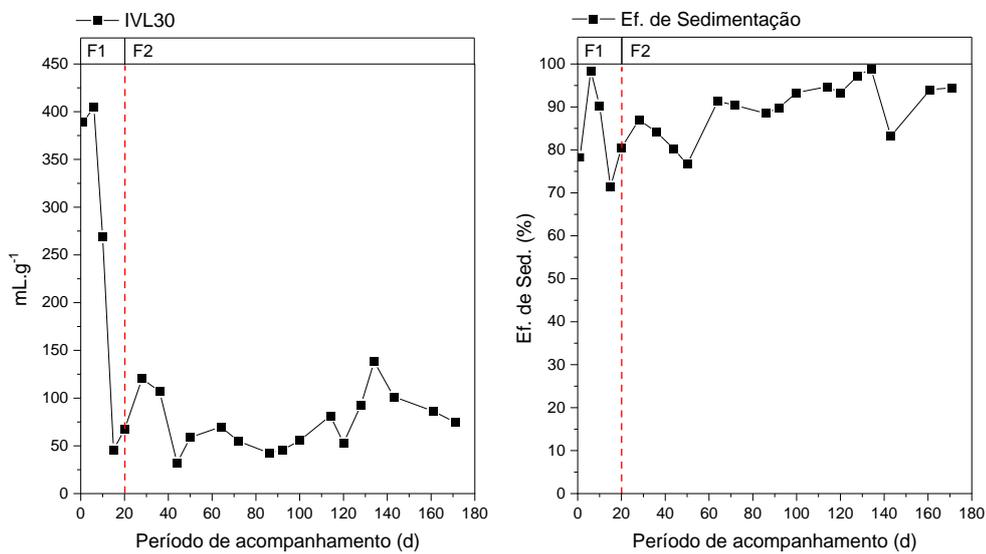
Os valores indicam também uma maior concentração de EPS do tipo proteína, frequentemente associado a uma melhor estabilidade e sedimentabilidade do agregado. Em um estudo de Zhao *et al.* (2018), foi verificada a influência negativa exercida por razões DQO/N afluentes menores que 4, o que vem a prejudicar a estabilidade dos flocos AMAB. Apesar do valor de DQO/N-NH₄⁺ do esgoto afluente na presente pesquisa se encontrar próximo, não se verificou tal efeito com clareza. Ao contrário, a manutenção da concentração de EPS, em especial do tipo proteína,

seguiu constante até o fim do período operacional, o que pode indicar que a biomassa heterotrófica não foi diretamente atacada pelos zooplânctons, mas o desequilíbrio causado por esses prejudicou os produtores de EPS a longo prazo.

5.2.6. IVL30 e Eficiência de Floculação

Na figura 34, abaixo, se encontram descritos os dados de IVL30 e eficiência de sedimentação.

Figura 34 - Acompanhamento de IVL30 e Eficiência de sedimentação do lodo AMAB produzido na LAT ao longo do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

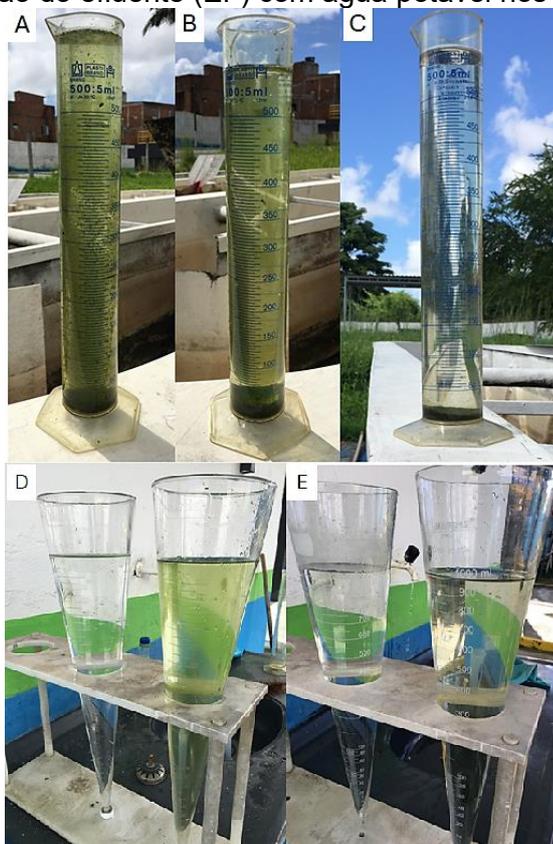
Como observado na figura 34 da Fase 1, a lagoa partiu de um alto IVL30 de quase 400 mL.g⁻¹. A já comentada redução na concentração de sólidos suspensos voláteis associada a uma concentração estável de EPS produzido, geraram um aumento da quantidade de EPS relativo à biomassa, o que deve ter facilitado a formação dos flocos e, conseqüentemente, reduzido o IVL30 ao longo da Fase 1. A Fase 2 apresenta uma média de IVL30 de aproximadamente 76 ± 14 mL.g⁻¹, valor consideravelmente mais alto que outras como (Dos Santos Neto *et al.*, 2021), que obtiveram 61 ± 15, 51 ± 3 e 32 ± 5 mL.g⁻¹ em bateladas únicas e fluxo contínuo de LATs de bancada além de Sátiro (2021), cujo cultivo de AMAB em LAT sob fluxo contínuo resultou em um IVL30 de 19,83 ± 28,54 mL.g⁻¹. Entretanto, é bem

estabelecido que um valor abaixo de 100 mL.g⁻¹ já define um lodo bem sedimentável segundo os parâmetros de IVL30, limite atendido pela presente pesquisa.

Adicionalmente, a eficiência de floculação assume um desempenho consistente e alto no período dos dias 66 e 128. A tendência dos primeiros dias da fase 2 foram de queda e se alinham com o período de dominância de *Desmodesmus* sp. Em contrapartida, durante a dominância de *Cyclotella* sp., microalga mais sedimentável devido à sua parede celular silicosa, a tendência é de aumento da eficiência. A interrupção só ocorre após o ataque de *Daphnia* sp., o que provavelmente aumenta o nível de detritos, células mortas e células desagregadas.

A média para o período de 66 a 128 foi de 92,3 ± 2,0 %, semelhante a sistemas contínuos em escala de bancada como o de Dos Santos Neto *et al.* (2021), que obteve 78 ± 6 %. Além disso, Vandamme *et al.* (2012) verificou a autofloculação de *Chlorella vulgaris* apenas em pH 11 e com eficiência de 75%. A combinação dos fatores discutidos levou aos resultados mostrados na figura 35.

Figura 35 - Sedimentação do liquor misto da LAT após 30 minutos nos dias 30 (A), 44 (B), e 100 (C) e comparação do efluente (EF) com água potável nos dias 44 (D) e 100 (E).



Fonte: O Autor (2024).

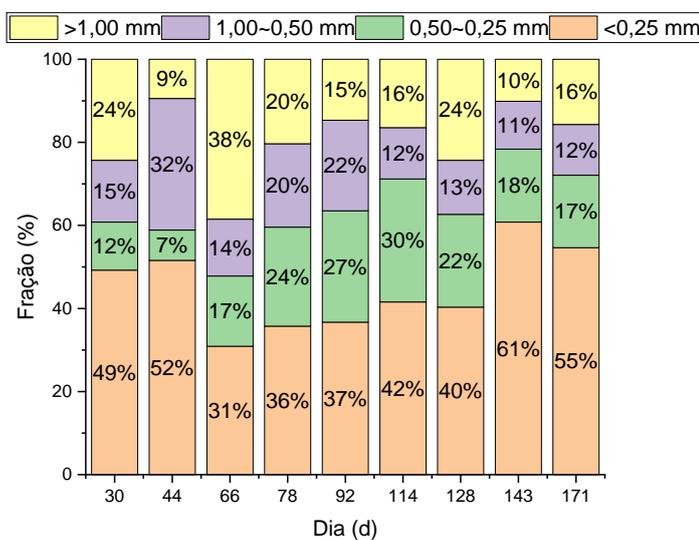
Como é possível observar, em ambas se vê que o desempenho da sedimentabilidade da biomassa encontrou seu ápice no período de predominância de *Cyclotella* sp. Enquanto a biomassa demonstra alta capacidade de compactação e sedimentação, a clarificação empreendida atingiu níveis comparáveis à da água da torneira disponível pelo sistema de abastecimento. A sedimentação, como discutido, permite a plena separação sólido-líquido após o tempo reacional. Este é o cerne do tratamento de efluentes e permite também o melhor aproveitamento da biomassa produzida. Tendo em vista a viabilização da biorrefinaria de microalgas e sabendo que a colheita é a etapa atualmente mais custosa, os resultados dessa pesquisa demonstram que existem técnicas de otimização ainda não exploradas.

Em suma, a associação da operação em batelada sequencial, da maneira como foi feita, com as condições do esgoto utilizado como meio de cultivo, induziu um perfil constante e previsível de microalgas na biomassa, o que também esteve associado com a sedimentabilidade mais eficiente. Portanto, a otimização da técnica aqui apresentada tem potencial de entregar um desempenho promissor.

5.2.7. Granulometria do Flocos Microalga-Bactéria

Os dados de granulometria em dias específicos ao longo do experimento se encontram exibidos na figura 36, abaixo.

Figura 36 - Variação de granulometria do AMAB encontrado no liquor misto da lagoa ao longo do experimento.



Fonte: O Autor (2024).

A formação de grânulos está, em geral, associada a um lodo sedimentável e facilmente extraível. Para fins práticos, considera-se uma biomassa como granular quando esta possui 50% de sua granulometria acima de 0,2 mm (Daudt *et al.*, 2019). Como é possível observar, dos dias 66 a 128 esse requisito foi atendido com tranquilidade, corroborando todos os outros dados já apresentados. Um perfil de microalgas mais rico em diatomáceas (i. e.: *Cyclotella sp.*) pode ter mantido o sistema em um equilíbrio que otimizou os parâmetros de sedimentabilidade e granulometria.

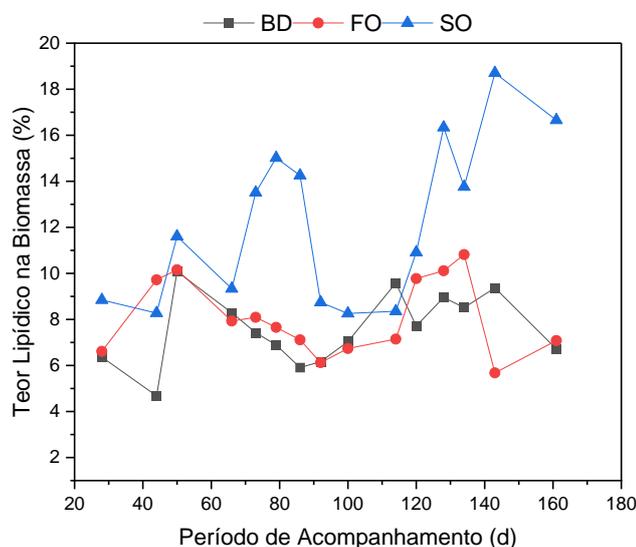
5.4. PERFIL DE LIPÍDIOS E DESEMPENHO DO BIODIESEL

Nesta seção, são apresentados os dados de extração de lipídios da biomassa algal-bacteriana. Avaliou-se o rendimento entre três metodologias de extração e seus perfis de metil ésteres de ácidos graxos, principal componente do biodiesel, com base nos ácidos formadores. Esse perfil foi utilizado para calcular o número de cetano e o valor de iodo, permitindo a comparação com legislações vigentes no mundo.

5.3.1. Teor de Lipídios *versus* metodologias de extração

Na figura 37, se encontram os dados de teor lipídico na biomassa seca, obtido com as três metodologias utilizadas.

Figura 37 - Teor de lipídio obtido por meio das 3 metodologias operadas. BD - Bligh; Dyer (1957); FO - Folch; Lees; Stanley (1957); SO – Soxhlet.



Fonte: O Autor (2024).

É possível observar que a metodologia de extração de Soxhlet apresentou um desempenho que se sobressaiu entre os demais. Tal metodologia opera por um esgotamento da biomassa com o solvente por várias horas e tem a característica de entregar rendimentos tipicamente altos. Entretanto, é uma metodologia custosa em energia e o calor do aquecimento tende a degradar os lipídios di e tri-insaturados da amostra. Embora estes sejam indesejáveis no biodiesel, possuem alto valor nutricional, como é o caso do ômega-3 e ômega-6.

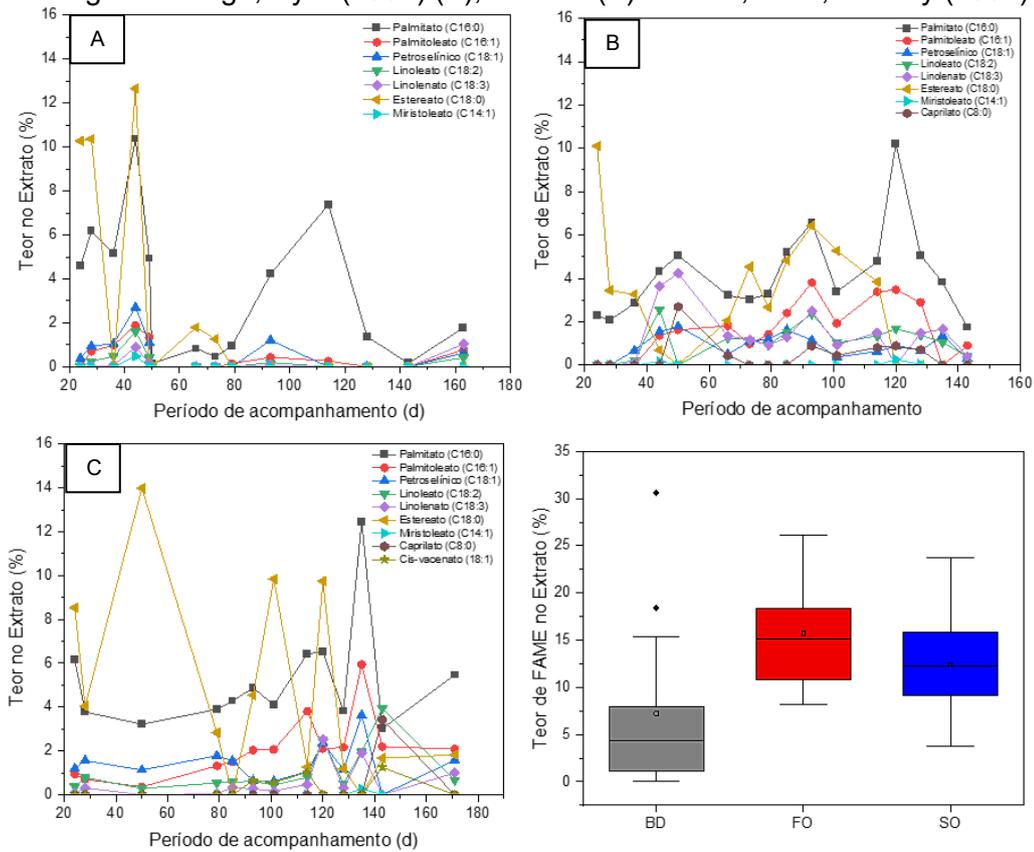
As médias obtidas foram de $7,58 \pm 0,78$ % (BD); $8,05 \pm 0,83$ (FO) e $12,17 \pm 1,79$ % (SO) e as extrações de SO e BD se mostraram estatisticamente semelhantes. Em um sistema LAT de 1500 L cultivando a espécie algal *Chlorella minutíssima*, (Sharma *et al.*, 2021) obtiveram um teor lipídico de 19,89% por meio da metodologia de Soxhlet. Tendo em vista a co-cultura com bactérias e o perfil misto de microalgas, a redução observada nos dados da extração em Sóxhlet da presente pesquisa foi considerada dentro do esperado.

Além do teor de lipídios global, cabe ressaltar que um dado mais importante ainda é o teor de FAME no extrato, compostos que de fato contribuirão para um biodiesel de qualidade.

5.3.2. Perfil de Metil Ésteres de Ácidos Graxos (FAMES)

O acompanhamento do perfil de FAMES a partir dos extratos lipídicos se encontram na figura 38, abaixo.

Figura 38 - Perfil de ácidos graxos ao longo do experimento obtidos a partir das metodologias de Bligh; Dyer (1957) (A), Soxhlet (B) e Folch; Lees; Stanley (1957) (C).



Fonte: O Autor (2024).

É perceptível uma predominância do ácido palmitato (C16:0) e, em menor grau, do ácido estereato (C18:0) nos perfis temporais. Ácidos graxos saturados, como o caso de ambos, não possuem ligações duplas, pontos atacados por oxidantes, o que causa a degradação do biodiesel da refinaria à bomba e sua maior presença está associada a um biodiesel de melhor qualidade. Nota-se que as extrações de FO e SO apresentaram menos variabilidade e teores mais altos nas concentrações desses ácidos. Assim, a contribuição dos FAME no extrato lipídico se mostrou mais elevada para FO e SO. Em suma, as extrações de Folch; Lees; Stanley (1957) e Soxhlet demonstraram uma maior seletividade de lipídios.

Segundo Mehrabadi; Craggs; Fari (2016), um biodiesel algal de qualidade deve possuir, necessariamente, os lipídios do tipo C16:0, C18:1 e C18:2. Nas tabelas do Anexo 1, encontram-se a porcentagem de contribuição de cada ácido graxo sob cada extração ao longo do período de monitoramento. A partir dos dados, as médias de

contribuição dos fames C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2 foram estimadas em suas médias para cada método de extração, como indica a tabela 10, abaixo.

Tabela 10 - Teor médio de FAMES de interesse obtidos à partir das 3 metodologias avaliadas.

	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
BD	62,5 ± 15,5 %	21,9 ± 3,1 %	5,5 ± 3,6 %	2,1 ± 1,6 %
FO	35,0 ± 5,9 %	27,7 ± 12,2 %	6,8 ± 3,3 %	9,7 ± 3,0 %
SO	35,7 ± 4,8 %	21,0 ± 10,0 %	8,8 ± 2,4 %	7,6 ± 2,2 %

Fonte: O Autor (2024).

Em estudos como o de Hernández-García *et al.* (2019), o cultivo de *Desmodesmus* sp. em lixiviado resultou em uma parcela dos ácidos graxos C16:0, C18:1 e C18:2 de 16, 0 e 9 % no total de FAME. Outro estudo de Jarungkeerativilomol *et al.* (2023) apontou as frações de 36,7%, 7,9% e 7,7%, para os respectivos ácidos. Apesar da biomassa da presente pesquisa se compor de um consórcio misto algal-bacteriano, a proporção de ácidos graxos específicos de interesse demonstrou estar alinhado com resultados de culturas puras, mais controladas e selecionadas.

Além disso, a contribuição média elevada de C16:0 apresentada pela extração BD pode estar mascarada por extrações em que pequenas quantidades desse ácido graxo foram as únicas encontradas no extrato. Supõe-se que essas amostras tenham sofrido degradação em seus lipídios, restando somente o C16:0, o que fez com que a contribuição atingisse 100%, elevando a média observada. Como se observa no apêndice C, isso ocorre nos dias 128, 135, 146 e, em menor grau, 114.

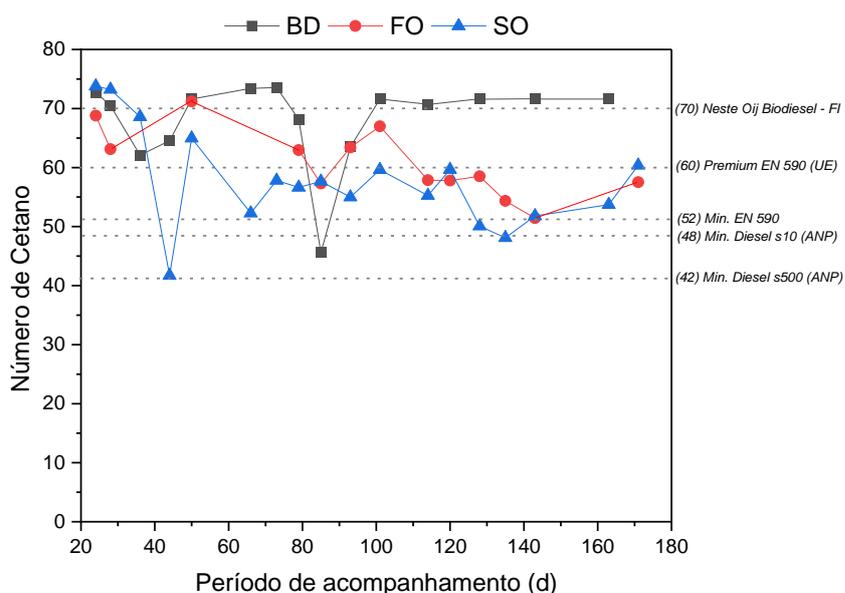
Ressalta-se, entretanto, que a proporção entre os FAME deve ser tão levada em consideração quanto a porcentagem de FAME no extrato e o rendimento lipídico em si. A combinação desses três fatores, à princípio, estará associada à viabilidade do biodiesel, visto que se deve buscar a combinação entre rendimento total, rendimento de FAME e rendimento de ácidos graxos específicos de interesse. Enquanto vê-se que SO tem melhor rendimento total, FO tem um melhor rendimento de FAMES totais e BD tem um melhor desempenho em fames específicos (considerando-se os efeitos suspeitos já mencionados). Portanto, esses dados indicam que a aplicação de uma metodologia de extração deve ser feita com um

estudo aprofundado do desempenho frente à biomassa em estudo, comparando-se com outras disponíveis.

5.3.3. Desempenho do Biodiesel

Apesar do perfil de lipídios dar indícios da qualidade do biodiesel, cálculos são necessários para levar a um melhor entendimento do combustível produzido. O principal fator nesse sentido é o número de cetano, parâmetro associado ao atraso do diesel no motor e estabelecido por legislações rígidas ao redor do mundo. Na figura 39, abaixo, encontram-se os dados de número de cetano para as três metodologias utilizadas no estudo.

Figura 39 - Números de Cetano do Biodiesel obtido a partir das metodologias de extração avaliadas.

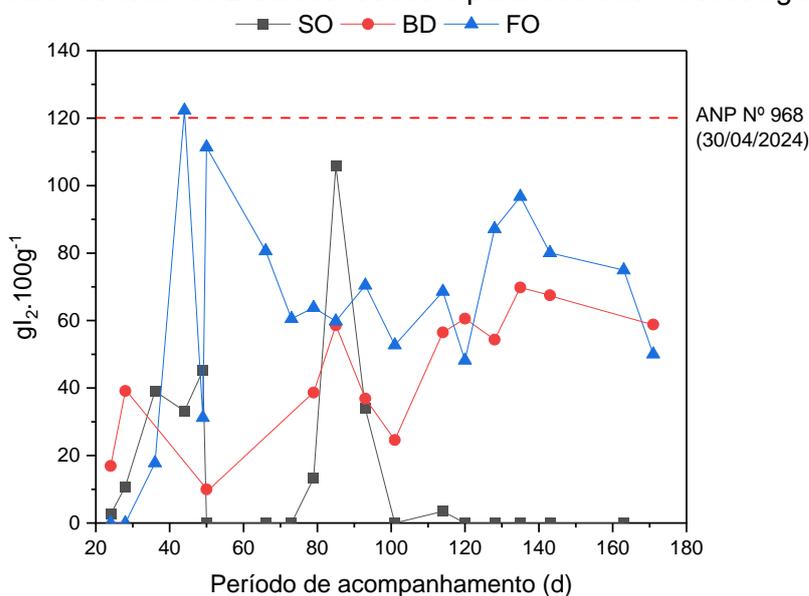


Fonte: O Autor (2024).

Os dados são claros em mostrar que, ao longo do experimento, todos os extratos atenderam às normas de exigência. Fora o outlier do dia 44, a extração em Soxhlet atendeu sempre à Resolução 968 de 30/04/2024 da ANP para o diesel S10, mais exigente e usado nas cidades. Já a extração de Folch atingiu um patamar mínimo para a norma europeia, ainda mais criteriosa, chegando a alcançar os níveis de diesel premium. Por fim, a extração de BD alcançou por 60 dias o surpreendente patamar de NC 70, encontrado no biodiesel produzido pela empresa Finlandesa Neste Oij.

Outro parâmetro também importante é o valor de iodo, associado à estabilidade oxidativa do biodiesel e fixado em um limite máximo de 120 g de iodo molecular para 100 gramas de biodiesel. Os resultados encontrados na figura 40, abaixo, indicam a continuidade do atendimento às normas, exceto pelo outlier de FO do dia 44. Em suma, esses dados indicam que praticamente nenhum lipídio extraído da LAT ao longo dos 151 dias da fase 2 se mostrou particularmente vulnerável ao ataque de oxidante. Cabe ressaltar que os dados são fruto das análises cromatográficas e as oxidações sugeridas para os dias selecionados da extração BD pode ter ocorrido, se houveram, antes da análise em si.

Figura 40 - Valor de Iodo do Biodiesel obtido a partir das três metodologias avaliadas.



Fonte: O Autor (2024).

Até onde se sabe, esta é a primeira descrição do atendimento às normas de qualidade do biodiesel produzido ao longo de quase 6 meses a partir de uma biomassa algal-bacteriana granular oriunda de lodo ativado e cultivada em LAT de escala piloto. Cabe ressaltar que o grande desafio de sistemas abertos é o impacto da variabilidade no cultivo sob os compostos bioderivados. Ao menos dentro da metodologia de cultivo utilizada nesta pesquisa, os dados mostram que o atendimento a qualidade por lipídios de biomassa AMAB não é um desafio. O foco deve ser guiado para a confirmação desses dados e a otimização do rendimento lipídico sem perda das propriedades satisfatórias hora encontradas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos ao longo do estudo evidenciam o potencial dos agregados microalga-bactéria (AMAB) cultivados em lagoas de alta taxa (LAT) operadas em batelada sequencial (BS) para o tratamento de esgoto e a produção de biodiesel. As principais conclusões são:

- Após 14 dias, a inoculação resultou na formação bem-sucedida de uma biomassa agregada. No entanto, dados de sólidos suspensos voláteis (SSV), clorofila-a e EPS (substâncias poliméricas extracelulares) sugeriram sinais de estresse celular após esse período, destacando a necessidade de ajustes operacionais.
- Entre os dias 66 e 128, a ressuspensão promovida pelo regime de batelada facilitou o acesso à luz para as microalgas do gênero *Cyclotella* sp., que predominaram devido à forma de carbono inorgânico do esgoto. Esse fator levou a uma comunidade microalgal mais estável e previsível, favorecendo o desempenho do sistema.
- A razão carbono/nitrogênio (C/N) de $5,62 \pm 0,75$ do esgoto propiciou a formação de comunidades nitrificantes, resultando no acúmulo de nitrato. Este fato sugere a necessidade de estratégias para o controle de fontes de carbono que possam favorecer a assimilação completa do nitrogênio.
- A presença de *Cyclotella* sp. resultou em uma menor alcalinização do meio (valor de pH entre 7,21 e 7,34), o que, embora menos prejudicial às células, permitiu a presença de *Daphnia* sp., zooplâncton que atacou preferencialmente as células de *Cyclotella* sp., menores e menos protegidas em comparação a outras espécies, como *Desmodesmus* sp.
- Os dados de remoção de amônia (90%) e de demanda química de oxigênio (DQO total) ($66,59 \pm 7,64\%$) foram satisfatórios. Embora a remoção de fósforo tenha ficado abaixo do esperado, o pH neutro observado indica que parte do fósforo foi incorporada na biomassa microalgal, o que reforça a importância da assimilação biológica nesse processo.
- O regime de batelada sequencial promoveu a produção de biomassa altamente sedimentável, com características granulares. Essa propriedade é fundamental para reduzir custos de colheita e facilitar o manejo operacional do sistema.

- Dentre as metodologias avaliadas, a extração por Soxhlet (SO) foi a mais eficiente, com um rendimento de 12,17%, seguida pela extração por Folch; Lees; Stanley (1957) (FO) e por Bligh; Dyer (1957) (BD). As extrações por SO e FO geraram perfis de ésteres de ácidos graxos metílicos (FAME) mais estáveis ao longo do tempo, especialmente para os ácidos graxos C16:0, C18:1 e C18:2, que são os principais precursores de biodiesel de alta qualidade.
- O biodiesel produzido a partir da biomassa AMAB satisfaz os requisitos das normas europeias para qualidade do biodiesel em grande parte dos pontos de medição. O valor de iodo, utilizado como parâmetro de estabilidade oxidativa, permaneceu dentro das exigências da ANP (Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis) em praticamente todos os pontos monitorados.

De forma geral, pode ser concluído que a operação em regime de batelada sequencial se mostrou eficaz para o tratamento de esgoto doméstico pré-tratado por reator UASB e a produção de biodiesel em lagoa de alta taxa em escala piloto. O desempenho ao longo do tempo foi satisfatório e consistente com os melhores resultados reportados na literatura. O sistema demonstrou potencial para a produção de biomassa sedimentável e lipídios de alta qualidade, evidenciando que ajustes operacionais e a compreensão das dinâmicas microbianas podem maximizar a eficiência.

7. RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

A partir das conclusões inferidas a partir desta pesquisa, sugerem-se os pontos adiante para melhor elucidar os efeitos ocorridos.

- Elevar a carga orgânica aplicada na LAT a fim de aumentar a razão carbono/nitrogênio e favorecer o crescimento das heterotróficas em detrimento das nitrificantes;
- Testar o sistema de LAT em série sob batelada sequencial para verificar a remoção das formas residuais de nitrogênio (nitrito e nitrato) e fósforo;
- Verificar a validade de estratégias para o controle do zooplâncton, como é o caso da redução do TDH, o que pode causar uma lavagem e choque com altas concentrações de nitrogênio amoniacal;
- Estudar, por meio de sequenciamento genético, a variabilidade de espécies de microalgas que compõem os gêneros encontrados. Dessa forma, verificar a possibilidade do isolamento de microalgas de desempenho mais significativo para a sua possível inoculação no sistema;

REFERÊNCIAS

- AHMAD, J. S. M. *et al.* Algal-bacterial aerobic granule based continuous-flow reactor with effluent recirculation instead of air bubbling: Stability and energy consumption analysis. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 7, p. 100215, 2019.
- ALCÁNTARA, C. *et al.* Microalgae-based Wastewater Treatment. *In*: HANDBOOK OF MARINE MICROALGAE. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 439–455. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128007761000297>. Acesso em: 7 abr. 2024.
- ALISHAH ARATBONI, H. *et al.* Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 178, 2019.
- ALVEAL VILLENA, K. *et al.* (org.). **Manual de metodos ficologicos**. Concepcion, Chile: Universidad de Concepcion, 1995.
- AN, S. S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic Relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons. **Plant Biology**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 418–428, 1999.
- ANANTHI, V. *et al.* A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. **Fuel**, [s. l.], v. 284, p. 118965, 2021.
- APHA; AWWA; WEF (org.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington (D.C.): American public health association, 2012.
- ARASHIRO, L. T. *et al.* The effect of primary treatment of wastewater in high rate algal pond systems: Biomass and bioenergy recovery. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 280, p. 27–36, 2019.
- ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G. Influence of solar irradiance levels on the formation of microalgae-bacteria aggregates for municipal wastewater treatment. **Algal Research**, [s. l.], v. 27, p. 190–197, 2017.
- ARCILA, J. S.; BUITRÓN, G. Microalgae–bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 91, n. 11, p. 2862–2870, 2016.
- ARORA, N. *et al.* Small-scale phyco-mitigation of raw urban wastewater integrated with biodiesel production and its utilization for aquaculture. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 297, p. 122489, 2020.
- ASSIS, L. R. de *et al.* Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 274, 2020.

BABIAK, W.; KRZEMIŃSKA, I. Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. **Energies**, [s. l.], v. 14, n. 13, p. 4007, 2021.

BANKSTON, E.; WANG, Q.; HIGGINS, B. T. Algae support populations of heterotrophic, nitrifying, and phosphate-accumulating bacteria in the treatment of poultry litter anaerobic digestate. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 398, p. 125550, 2020.

BARKIA, I.; SAARI, N.; MANNING, S. R. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 304, 2019.

BELL, T. A. S. *et al.* A Lipid-Accumulating Alga Maintains Growth in Outdoor, Alkaliphilic Raceway Pond with Mixed Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01480/abstract>. Acesso em: 11 jul. 2024.

BENVENUTI, G. *et al.* Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 3167–3177, 2016.

BHANDARI, M. *et al.* An integration of algae-mediated wastewater treatment and resource recovery through anaerobic digestion. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 342, p. 118159, 2023.

BHARTI, M. K. *et al.* Nanoferrites heterogeneous catalysts for biodiesel production from soybean and canola oil: a review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 3727–3746, 2021.

BILIANI, S. E.; MANARIOTIS, I. D. Sustainable treatment of primary and secondary effluent by algal-bacterial flocculent biomass in raceway ponds. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 343, p. 118167, 2023.

BITTON, G. **Wastewater microbiology**. 4th eded. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

BOROWITZKA, M. A. Biology of Microalgae. *In: MICROALGAE IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION*. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 23–72. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128114056000037>. Acesso em: 7 out. 2023.

BRANDÃO, C. J. *et al.* (org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Brasília, DF: São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

BUITRÓN, G.; CORONADO-APODACA, K. G. Influence of the solids retention time on the formation of the microalgal-bacterial aggregates produced with municipal wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 46, 2022.

BUTTERWORTH, S.; FALLOWFIELD, H. Comparison of the wastewater treatment performance of continuously and discontinuously mixed high-rate algal ponds at Kingston on Murray. **Water Science & Technology**, [s. l.], p. wst2024020, 2024.

CAMPOS, J. R. (org.). **Tratamento de esgotos sanitários por processos anaeróbios e disposição controlada no solo**. 1. ed. Rio de Janeiro: ABES, 1999. v. 1

CHANDRA, R. *et al.* Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 278, p. 346–359, 2019.

CHEN, X. *et al.* The interactions of algae-activated sludge symbiotic system and its effects on wastewater treatment and lipid accumulation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 292, p. 122017, 2019.

CHERNICHARO, C. A. L. *et al.* Anaerobic sewage treatment: state of the art, constraints and challenges. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 649–679, 2015.

CHEW, K. W. *et al.* Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 91, p. 332–344, 2018.

CHHANDAMA, M. V. L. *et al.* Microalgae as a feedstock for the production of biodiesel: A review. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 15, p. 100771, 2021.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 126–131, 2008.

CHO, D.-H. *et al.* Organic carbon, influent microbial diversity and temperature strongly influence algal diversity and biomass in raceway ponds treating raw municipal wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 191, p. 481–487, 2015.

COLMAN, B. *et al.* The diversity of inorganic carbon acquisition mechanisms in eukaryotic microalgae. **Functional Plant Biology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 261, 2002.

COLMAN, B.; ROTATORE, C. Photosynthetic inorganic carbon uptake and accumulation in two marine diatoms. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 919–924, 1995.

DANESHVAR, E. *et al.* Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO₂ biofixation and biomass valorization – A review. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 427, p. 130884, 2022.

DAUDT, G. C. *et al.* RESEARCHING NEW WAYS TO REDUCE N₂O EMISSION FROM A GRANULAR SLUDGE SEQUENCING BATCH REACTOR TREATING DOMESTIC WASTEWATER UNDER SUBTROPICAL CLIMATE CONDITIONS. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 209–220, 2019.

DEBENI DEVI, N. *et al.* Bioremediation of domestic wastewater with microalgae-cyanobacteria co-culture by nutritional balance approach and its feasibility for biodiesel and animal feed production. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 454, p. 140197, 2023.

DOS SANTOS, A. G. **FORMAÇÃO DE AGREGADOS MICROALGAS-BACTÉRIAS EM LAGOAS DE ALTA TAXA VISANDO A RECUPERAÇÃO DE RECURSOS E O TRATAMENTO DE ESGOTO**. 2023. 130 f. Doutorado em Engenharia Civil - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

DOS SANTOS NETO, A. G. *et al.* Strategy for the formation of microalgae-bacteria aggregates in high-rate algal ponds. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1863–1876, 2021.

DUBOIS, Michel. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DUTTA, A.; DAVIES, C.; IKUMI, D. S. Performance of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and other anaerobic reactor configurations for wastewater treatment: a comparative review and critical updates. **Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua**, [s. l.], v. 67, n. 8, p. 858–884, 2018.

FALLAHI, A. *et al.* Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 272, p. 129878, 2021.

FENG, P. *et al.* Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 114, n. 4, p. 405–410, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 226, n. 1, p. 497–509, 1957.

FRANCISCO, É. C. *et al.* Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 395–403, 2010.

GAMA, R. C. N. D. *et al.* Influence of C/N ratio on microalgae-bacteria joint culture: Treatment performance and phytoplankton dynamics in mixed wastewaters. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 23, p. 101516, 2023.

GONZÁLEZ, M. T. V. *et al.* Harvesting microalgae using ozone-air flotation for recovery of biomass, lipids, carbohydrates, and proteins. **Environmental Technology (United Kingdom)**, [s. l.], v. 42, n. 21, p. 3267–3277, 2021.

GRANATA, T. Dependency of Microalgal Production on Biomass and the Relationship to Yield and Bioreactor Scale-up for Biofuels: a Statistical Analysis of 60+ Years of Algal Bioreactor Data. **BioEnergy Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 267–287, 2017.

GRESSLER, P. D. **AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE *Desmodesmus subspicatus* (R.Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt (CHLOROPHYCEAE) CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR TUBULAR COM EFLUENTE DA ETE-UNISC, VISANDO BIORREMEDIAÇÃO E OBTENÇÃO DE ENERGIA**. 2011. 130 f. - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.

GRIMA, E. M. *et al.* Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, [s. l.], v. 71, n. 9, p. 955–959, 1994.

GUO, W.-Q. *et al.* Minimization of excess sludge production by in-situ activated sludge treatment processes — A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1386–1396, 2013.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

HAN, S.-F. *et al.* Application of pulse electric field pretreatment for enhancing lipid extraction from *Chlorella pyrenoidosa* grown in wastewater. **Renewable Energy**, [s. l.], v. 133, p. 233–239, 2019.

HE, Y. *et al.* Enhanced brewery wastewater purification and microalgal production through algal-bacterial synergy. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 376, p. 134361, 2022.

HE, Q.; YANG, H.; HU, C. Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 218, p. 571–579, 2016.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, A. *et al.* Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 174, p. 435–444, 2019.

HIGGINS, B. T. *et al.* Algal–bacterial synergy in treatment of winery wastewater. **npj Clean Water**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 6, 2018.

HIMAWAN, C.; STAROV, V. M.; STAPLEY, A. G. F. Thermodynamic and kinetic aspects of fat crystallization. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 122, n. 1–3, p. 3–33, 2006.

HO, S.-H. *et al.* Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae — A critical review. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 1448–1459, 2014.

HO, L.; GOETHALS, P. L. M. Municipal wastewater treatment with pond technology: Historical review and future outlook. **Ecological Engineering**, [s. l.], v. 148, p. 105791, 2020.

IHNKEN, S. *et al.* Light acclimation and pH perturbations affect photosynthetic performance in *Chlorella* mass culture. **Aquatic Biology**, [s. l.], v. 22, p. 95–110, 2014.

INDARTI, E. *et al.* Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 18, n. 2–3, p. 161–170, 2005.

IPCC. **Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Geneva, Switzerland: Cambridge University, 2023. Disponível em: https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/downloads/report/IPCC_AR6_SYR_LongerReport.pdf. Acesso em: 20 set. 2024.

JARUNGKEERATIVIMOL, P. *et al.* Screening of high lipid content and productivity of microalgae under photoautotrophic cultivation for biodiesel production. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. e13950, 2023.

Jl, X. *et al.* The interactions of algae-bacteria symbiotic system and its effects on nutrients removal from synthetic wastewater. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 247, p. 44–50, 2018.

JIMOH, T. A.; KESHINRO, M. O.; COWAN, K. A. Microalgal–Bacterial Flocs and Extracellular Polymeric Substances: Two Essential and Valuable Products of Integrated Algal Pond Systems. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s. l.], v. 230, n. 4, p. 95, 2019.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

KATO, M. T.; FLORENCIO, L. Pós-tratamento de efluente anaeróbio em lagoa de polimento. *In*: CHERNICHARO, C. A. L. (ed.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaerobios**. 1. ed. Belo Horizonte: [s. n.], 2001. v. 2.

KESHINRO, T. A. *et al.* Aggregation/disaggregation of microalgal-bacterial flocs in high-rate oxidation ponds is a response to biotic/abiotic-induced changes in microbial community structure. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10811-024-03196-z>. Acesso em: 18 abr. 2024.

KHAN, A. A. *et al.* Effect of Aeration on the Quality of Effluent from UASB Reactor Treating Sewage. **Journal of Environmental Engineering**, [s. l.], v. 137, n. 6, p. 464–471, 2011.

KSELÍKOVÁ, V. *et al.* Improving microalgae for biotechnology — From genetics to synthetic biology – Moving forward but not there yet. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 58, p. 107885, 2022.

LEE, J.-C. *et al.* Isolation and screening of indigenous microalgae species for domestic and livestock wastewater treatment, biodiesel production, and carbon sequestration. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 318, p. 115648, 2022.

LEE, R. E. **Phycology**: 5. ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 2018. Disponível em: <https://www.cambridge.org/highereducation/books/phyecology/9DF8F636A0D4B28E74F6CC7A05C407DF#contents>. Acesso em: 31 mar. 2024.

LEONG, W. H. *et al.* Co-cultivation of activated sludge and microalgae for the simultaneous enhancements of nitrogen-rich wastewater bioremediation and lipid production. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 87, p. 216–224, 2018.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, p. 107545, 2020.

LI, N. *et al.* Electrostatic charges on microalgae surface: Mechanism and applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 107516, 2022.

LIU, Y.; TAY, J.-H. Strategy for minimization of excess sludge production from the activated sludge process. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 97–107, 2001.

LIZZUL, A. M.; ALLEN, M. Algal Cultivation Technologies. *In*: LOVE, J.; BRYANT, J. A. (ed.). **Biofuels and Bioenergy**. 1. ed. [S. l.]: Wiley, 2017. p. 21. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118350553>. Acesso em: 7 abr. 2024.

LOBO, E.; LEIGHTON, G. Estructuras comunitarias de las fitocenosis planctonicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. **Revista Biología Marina y Oceanografía**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–29, 1986.

LOWRY, Oliver H. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LV, Z. *et al.* Modelling Economic Growth, Carbon Emissions, and Fossil Fuel Consumption in China: Cointegration and Multivariate Causality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 16, n. 21, p. 4176, 2019.

MALIHA, A.; ABU-HIJLEH, B. A review on the current status and post-pandemic prospects of third-generation biofuels. **Energy Systems**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1185–1216, 2023.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MATHEW, M. M. *et al.* Biological Approaches Integrating Algae and Bacteria for the Degradation of Wastewater Contaminants—A Review. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 801051, 2022.

MEDINA, A. R. *et al.* Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 517–580, 1998.

MEHRABADI, A.; CRAGGS, R.; FARID, M. M. Biodiesel production potential of wastewater treatment high rate algal pond biomass. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 221, p. 222–233, 2016.

METCALF & EDDY (org.). **Wastewater engineering: treatment and resource recovery**. 5. ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2014.

MHEDHBI, E. *et al.* Real-Time Behavior of a Microalgae–Bacteria Consortium Treating Wastewater in a Sequencing Batch Reactor in Response to Feeding Time and Agitation Mode. **Water**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1893, 2020.

MONTEMEZZANI, V. *et al.* A review of potential methods for zooplankton control in wastewater treatment High Rate Algal Ponds and algal production raceways. **Algal Research**, [s. l.], v. 11, p. 211–226, 2015.

MONTEMEZZANI, V.; VAN WAGENBERG, H.; CRAGGS, R. J. Modification of hydraulic retention time in open raceway ponds to prevent rotifers and cladocerans establishment. **Algal Research**, [s. l.], v. 69, p. 102910, 2023.

NEGI, S. *et al.* Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 803–812, 2016.

NÓBREGA, R. S.; FARIAS, R. F. D. L.; SANTOS, C. A. C. D. Variabilidade temporal e espacial da precipitação pluviométrica em Pernambuco através de índices de extremos climáticos. **Revista Brasileira de Meteorologia**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 171–180, 2015.

OKEKE, E. S. *et al.* Microalgae biorefinery: An integrated route for the sustainable production of high-value-added products. **Energy Conversion and Management: X**, [s. l.], v. 16, p. 100323, 2022.

OLGUÍN, E. J. *et al.* Microalgae-Based Biorefineries: Challenges and Future Trends to Produce Carbohydrate Enriched Biomass, High-Added Value Products and Bioactive Compounds. **Biology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1146, 2022.

OTERO, A.; FÁBREGAS, J. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. **Aquaculture**, [s. l.], v. 159, n. 1–2, p. 111–123, 1997.

PANDEY, S. *et al.* Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges. **Fuel**, [s. l.], v. 367, p. 131547, 2024.

- PANDEY, A. (org.). **Biofuels from algae**. First edition. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 35–42, 2011.
- PAUL, S. *et al.* Review on the recent structural advances in open and closed systems for carbon capture through algae. **Energy Nexus**, [s. l.], v. 4, p. 100032, 2021.
- PEREZ-GARCIA, O. *et al.* Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 11–36, 2011.
- QU, D.; MIAO, X. Carbon flow conversion induces alkali resistance and lipid accumulation under alkaline conditions based on transcriptome analysis in *Chlorella* sp. BLD. **Chemosphere**, [s. l.], v. 265, p. 129046, 2021.
- REHMAN, M. *et al.* Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], 2022.
- RENUKA, N. *et al.* Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 6608–6620, 2016.
- REZVANI, F. *et al.* Optimal strategies for bioremediation of nitrate-contaminated groundwater and microalgae biomass production. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 25, n. 27, p. 27471–27482, 2018.
- REZVANI, F.; SARRAFZADEH, M.-H.; OH, H.-M. Hydrogen producer microalgae in interaction with hydrogen consumer denitrifiers as a novel strategy for nitrate removal from groundwater and biomass production. **Algal Research**, [s. l.], v. 45, p. 101747, 2020.
- ROSINI, E. F.; SANT'ANNA, C. L.; TUCCI, A. Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. **Hoehnea**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 661–678, 2013.
- RUGGIERO, M. A. *et al.* A Higher Level Classification of All Living Organisms. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e0119248, 2015.
- SALADINI, F. *et al.* Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 66, p. 221–227, 2016.
- SALES, M. *et al.* Start-up strategies to develop aerobic granular sludge and photogranules in sequential batch reactors. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 828, 2022.
- SALIBA, P. D.; VON SPERLING, M. Performance evaluation of a large sewage treatment plant in Brazil, consisting of an upflow anaerobic sludge blanket reactor followed by activated sludge. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 76, n. 8, p. 2003–2014, 2017.

SATIRO, J. *et al.* Effect of microalgae and bacteria inoculation on the startup of bioreactors for paper pulp wastewater and biofuel production. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 362, p. 121305, 2024.

SÁTIRO, J. R. **Fatores que influenciam a biofloculação de microalgas em lagoas de alta taxa com esgotos sanitários**. 2021. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2021.

SÁTIRO, J. *et al.* Optimization of Microalgae–Bacteria Consortium in the Treatment of Paper Pulp Wastewater. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 12, n. 12, 2022.

SCHWARZENBECK, N.; ERLEY, R.; WILDERER, P. A. Aerobic granular sludge in an SBR-system treating wastewater rich in particulate matter. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 49, n. 11–12, p. 41–46, 2004.

SEPEHRI, A.; SARRAFZADEH, M.-H. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, [s. l.], v. 128, p. 10–18, 2018.

SEPEHRI, A.; SARRAFZADEH, M.-H.; AVATEFFAZELI, M. Interaction between *Chlorella vulgaris* and nitrifying-enriched activated sludge in the treatment of wastewater with low C/N ratio. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 247, p. 119164, 2020.

SEREJO, M. L. *et al.* Surfactant removal and biomass production in a microalgal-bacterial process: effect of feeding regime. **Water Science and Technology**, [s. l.], v. 82, n. 6, p. 1176–1183, 2020.

SHARMA, A. K. *et al.* Production of a sustainable fuel from microalgae *Chlorella minutissima* grown in a 1500 L open raceway ponds. **Biomass and Bioenergy**, [s. l.], v. 149, p. 106073, 2021.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae during Uptake Dissolved Inorganic Carbon. **Plant and Cell Physiology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 649–657, 1993.

SHOW, K.-Y.; LEE, D.-J. Anaerobic Treatment Versus Aerobic Treatment. *In*: CURRENT DEVELOPMENTS IN BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 205–230. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636652000084>. Acesso em: 27 set. 2023.

SIERRA, L. S.; DIXON, C. K.; WILKEN, L. R. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. **Algal Research**, [s. l.], v. 25, p. 149–159, 2017.

SILAMBARASAN, S. *et al.* Removal of nutrients from domestic wastewater by microalgae coupled to lipid augmentation for biodiesel production and influence of deoiled algal biomass as biofertilizer for *Solanum lycopersicum* cultivation. **Chemosphere**, [s. l.], v. 268, p. 129323, 2021.

SINGH, S. K.; SUNDARAM, S.; KISHOR, K. Carbon-Concentrating Mechanism of Microalgae. *In*: SINGH, S. K.; SUNDARAM, S.; KISHOR, K. **Photosynthetic Microorganisms**. Cham: Springer International Publishing, 2014. (SpringerBriefs in Materials). p. 63–81. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-09123-5_4. Acesso em: 6 jun. 2024.

SOROOSH, H.; OTTERPOHL, R.; HANELT, D. Influence of supplementary carbon on reducing the hydraulic retention time in microalgae-bacteria (MaB) treatment of municipal wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 51, p. 103447, 2023.

SPALDING, M. H. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: Chlamydomonas inorganic carbon transporters. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 1463–1473, 2007.

SU, Y. Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 762, p. 144590, 2021.

SUN, Z. *et al.* Converting carbon dioxide to high value-added products: Microalgae-based green biomanufacturing. **GCB Bioenergy**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 386–398, 2023.

SUPARMANIAM, U. *et al.* Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 115, p. 109361, 2019.

SUTHERLAND, D. L. *et al.* Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 184, p. 222–229, 2015.

TAN, X. *et al.* Chlorella pyrenoidosa cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an airlift circulation photobioreactor. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 170, p. 538–548, 2014.

TAN, X. B. *et al.* Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 17–30, 2018.

TING, H. *et al.* Progress in microalgae cultivation photobioreactors and applications in wastewater treatment: A review. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–29, 2017.

TRAN, N.-A. T. *et al.* Photosynthetic carbon uptake induces autoflocculation of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. **Algal Research**, [s. l.], v. 26, p. 302–311, 2017.

TÜCCAR, G.; AYDIN, K. Evaluation of methyl ester of microalgae oil as fuel in a diesel engine. **Fuel**, [s. l.], v. 112, p. 203–207, 2013.

TUFANER, F. Post-treatment of effluents from UASB reactor treating industrial wastewater sediment by constructed wetland. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 912–920, 2020.

UGGETTI, E. *et al.* CO₂ addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater. **Journal of CO₂ Utilization**, [s. l.], v. 28, p. 292–298, 2018.

UMMALYMA, S. B. *et al.* Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 242, p. 227–235, 2017.

VALVERDE-PÉREZ, B. *et al.* Short-sludge age EBPR process – Microbial and biochemical process characterisation during reactor start-up and operation. **Water Research**, [s. l.], v. 104, p. 320–329, 2016.

VAN DEN HENDE, S. *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**, [s. l.], v. 218, p. 969–979, 2016.

VAN DEN HENDE, S. *et al.* Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 159, p. 342–354, 2014.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: Epgraf, 1994.

VANDAMME, D. *et al.* Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 105, p. 114–119, 2012.

VASSALLE, L. *et al.* Behavior of UV Filters, UV Blockers and Pharmaceuticals in High Rate Algal Ponds Treating Urban Wastewater. **Water**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 2658, 2020.

VULSTEKE, E. *et al.* Economic feasibility of microalgal bacterial floc production for wastewater treatment and biomass valorization: A detailed up-to-date analysis of up-scaled pilot results. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 224, p. 118–129, 2017.

WALKER, J. M. (org.). **The Protein Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. (Springer Protocols Handbooks). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-198-7>. Acesso em: 13 ago. 2024.

WANG, L. *et al.* Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 211, p. 1–5, 2016.

WANG, M. *et al.* Microalgae biofuels: illuminating the path to a sustainable future amidst challenges and opportunities. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 10, 2024.

WANG, M. *et al.* Transcriptome dynamics and hub genes of green alga *Nannochloris* sp. JB17 under NaHCO₃ stress. **Algal Research**, [s. l.], v. 54, p. 102185, 2021.

WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 554, 2010.

WU, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 170, p. 421–427, 2014.

XIAO, R.; ZHENG, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1225–1244, 2016.

XIAOGANG, H. *et al.* Microalgal growth coupled with wastewater treatment in open and closed systems for advanced biofuel generation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 1939–1958, 2022.

XIE, Y. *et al.* Advancement of renewable energy technologies via artificial and microalgae photosynthesis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 363, p. 127830, 2022.

XIE, Y. *et al.* Enhancing cell growth and lutein productivity of *Desmodesmus* sp. F51 by optimal utilization of inorganic carbon sources and ammonium salt. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 244, p. 664–671, 2017.

XU, Y. *et al.* The role of starvation in biomass harvesting and lipid accumulation: Co-culture of microalgae–bacteria in synthetic wastewater. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 103–109, 2016.

YANG, C.; DING, Z.; ZHANG, K. Growth of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from cassava ethanol fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2919–2925, 2008.

YOUNG, P.; TAYLOR, M.; FALLOWFIELD, H. J. Mini-review: high rate algal ponds, flexible systems for sustainable wastewater treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 117, 2017.

ZERVEAS, S. *et al.* Microalgal photosynthesis induces alkalization of aquatic environment as a result of H⁺ uptake independently from CO₂ concentration – New perspectives for environmental applications. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 289, p. 112546, 2021.

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

ZHANG, Z. *et al.* Nitrogen and Phosphorus Removal by Activated Sludge Process: A Review. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 99–106, 2017.

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

ZHANG, C.; LI, S.; HO, S.-H. Converting nitrogen and phosphorus wastewater into bioenergy using microalgae-bacteria consortia: A critical review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 342, p. 126056, 2021.

ZHAO, Z. *et al.* Response of algal-bacterial granular system to low carbon wastewater: Focus on granular stability, nutrients removal and accumulation. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 268, p. 221–229, 2018.

ZHOU, W. *et al.* Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s. l.], v. 76, p. 1163–1175, 2017.

ZHU, L. Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 801–814, 2015.

APÊNDICE A – METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS AVALIADOS

Nome IUPAC	Nome informal	Nº Carbonos
Hexanoato de metila	Caproato	C6:0
Octanoato de metila	Caprilato	C8:0
Decanoato de metila	Caprato	C10:0
Dodecanoato de metila	Laurato	C12:0
Tetradecanoato de metila	Miristato	C14:0
(Z)-tetradec-9-enoato de metila	Miristoleato	C14:1
Hexadecanoato de metila	Palmitato	C16:0
(Z)-hexadec-9-enoato de metila	Palmitoleato	C16:1
Octadecanoato de metila	Estereato	C18:0
(Z)-octadec-9-enoato de metila	Oleato	C18:1n9c
(Z)-octadec-11-enoato de metila	Cis-vacenato	C18:1n7c
(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienoato de metila	Linoleato	C18:2n6c
(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoato de metila	Linolenato	C18:3n6
Icosanoato de metila	Araquidato	C20:0
(Z)-icos-11-enoato de metila	Cis-11-eicosenoato	C20:1n9
(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoato de metila	Araquidonato	C20:4n6
Docosonoato de metila	Behenato	C22:0
(Z)-docos-13-enoato de metila	Erucato	C22:1n9
Tetradecosonoato de metila	Lignocerato	C24:0
(Z)-tetracos-15-enoato de metila	Nervoato	C24:1n9
(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoato de metila	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoato	C22:6n3

APÊNDICE B – TESTES ESTATÍSTICOS DA FASE 2

Tabela B1 – Teste t de Student para as médias de remoção de fósforo entre os dias 20 a 66 e 66 a 128 da Fase 2 de operação.

		Estatística	gl	p
Remoção de Fósforo Total (%)	t de Student	-3.26	11.0	0.008

Nota. $H_a \mu_{d20-d66} \neq \mu_{d66-d128}$

Tabela B2 – Médias de remoção de fósforo total entre os dias 20 a 66 e 66 a 128.

	Grupo	N	Média	Mediana	Desvio-padrão	Erro-padrão
Remoção de Fósforo Total (%)	d20-d66	5	19.5	18.5	11.9	5.32
	d66-d128	8	40.1	38.6	10.6	3.73

Tabela B3 – Testes t de Student entre as médias de extração lipídica de BD e FO

		Estatística	gl	p
Teor lipídico	t de Student	-0.807	28.0	0.426

Nota. $H_a \mu_{BD} \neq \mu_{FO}$

Tabela B4 – Médias entre as extrações lipídicas BD e FO

	Grupo	N	Média	Mediana	Desvio-padrão	Erro-padrão
Teor lipídico	BD	15	7.58	7.43	1.53	0.396
	FO	15	8.05	7.65	1.65	0.426

APÊNDICE C – PARCELA DE FAMES ESPECÍFICOS OBTIDOS

Tabela C1 – Perfil de FAMES no extrato obtido pela extração de SO.

Dia	Parcela de Metil Éster de Ácido Graxo (%)							
	Palmitato (C16:0)	Palmitoleato (C16:1)	Petroselínico (C18:1)	Linoleato (C18:2)	Linolenato (C18:3)	Estereato (C18:0)	Miristoleato (C14:1)	Caprilato (C8:0)
28	37,50	0,00	0,00	0,00	0,00	62,50	0,00	0,00
36	40,09	0,00	9,58	3,14	1,28	45,92	0,00	0,00
44	30,33	9,48	10,72	17,92	25,56	4,86	1,13	0,00
50	32,84	10,54	11,63	0,00	27,47	0,00	0,07	17,45
66	30,22	17,09	4,78	11,76	12,58	19,39	0,00	4,17
73	25,30	8,19	9,16	9,70	9,77	37,88	0,00	0,00
79	31,65	13,58	11,38	8,79	8,88	25,73	0,00	0,00
85	30,88	14,23	9,64	9,06	7,55	28,63	0,00	0,00
93	27,71	16,06	4,83	10,02	10,51	27,15	0,00	3,74
101	25,34	14,40	2,79	7,68	6,97	39,49	0,00	3,34
114	29,33	20,76	3,87	8,27	9,19	23,62	0,00	4,97
120	58,78	19,99	4,93	9,67	0,00	0,00	1,47	5,16
128	41,43	23,66	5,58	11,24	12,04	0,00	0,27	5,80
135	48,39	0,00	17,18	13,25	21,02	0,00	0,16	0,00
143	46,31	24,08	8,02	10,85	10,74	0,00	0,00	0,00

Tabela C2 – Perfil de FAMES no extrato obtido pela extração de BD.

Dia	Parcela de Metil Éster de Ácido Graxo (%)						
	Palmitato (C16:0)	Palmitoleato (C16:1)	Petroselínico (C18:1)	Linoleato (C18:2)	Linolenato (C18:3)	Estereato (C18:0)	Miristoleato (C14:1)
24	29,95	0,36	2,51	0,00	0,00	67,18	0,00
28	33,47	3,78	5,11	1,34	0,00	56,30	0,00
36	66,47	12,72	13,55	6,15	1,11	0,00	0,00
44	33,92	6,16	8,83	5,24	2,89	41,38	1,58
49	61,72	16,85	13,86	5,13	2,44	0,00	0,00
50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
66	31,51	0,00	0,00	0,00	0,00	68,49	0,00
73	26,75	0,00	0,00	0,00	0,00	73,25	0,00
79	86,70	13,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
93	68,82	7,04	19,73	3,15	1,26	0,00	0,00
114	96,57	3,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
128	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
143	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
163	38,53	16,59	13,53	8,97	22,38	0,00	0,00

Tabela C3 – Perfil de FAMES no extrato obtido pela extração de FO.

Dia	Parcela de Metil Éster de Ácido Graxo (%)							
	Palmitato (C16:0)	Palmitoleto (C16:1)	Petroselínico (C18:1)	Linoleato (C18:2)	Linolenato (C18:3)	Estereato (C18:0)	Caprilato (C8:0)	Cis-vacenoato (18:1)
24	35,67	5,44	6,91	2,15	0,50	49,33	0,00	0,00
28	33,77	6,25	13,93	7,04	2,81	36,20	0,00	0,00
50	16,96	1,90	5,97	1,51	0,00	73,66	0,00	0,00
79	37,45	12,65	17,06	5,18	0,49	27,17	0,00	0,00
85	52,04	18,19	18,76	7,00	4,01	0,00	0,00	0,00
93	35,78	14,93	4,80	4,50	1,94	33,34	0,00	4,72
101	23,09	11,58	3,45	2,56	0,92	55,29	0,00	3,12
114	43,27	25,62	7,15	5,30	3,18	8,53	0,00	6,97
120	25,30	8,19	9,16	9,69	9,80	37,87	0,00	0,00
128	41,80	23,66	12,55	5,59	3,43	12,97	0,00	0,00
135	47,59	22,68	13,85	7,52	7,35	0,00	0,00	0,00
143	19,42	14,15	0,00	25,46	0,00	10,77	22,13	8,07
171	43,26	16,57	12,54	5,26	7,91	14,46	0,00	0,00