

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

ALINE FIGUEREDO DASSOLER

**AVALIAÇÃO DE FONTES SÓLIDAS DE CARBONO
INORGÂNICO NA SUPLEMENTAÇÃO DO CULTIVO DE
MICROLAGAS EM EFLUENTE ANAERÓBIO**

Vitória

2019

ALINE FIGUEREDO DASSOLER

**AVALIAÇÃO DE FONTES SÓLIDAS DE CARBONO
INORGÂNICO NA SUPLEMENTAÇÃO DO CULTIVO DE
MICROLAGAS EM EFLUENTE ANAERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Ambiental, na área de concentração Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Servio Tulio Cassini

Co-orientador: Paulo Wagner Antunes

Vitória

2019

ALINE FIGUEREDO DASSOLER

**AVALIAÇÃO DE FONTES SÓLIDAS DE CARBONO INORGÂNICO NA
SUPLEMENTAÇÃO DO CULTIVO DE MICROLAGAS EM EFLUENTE
ANAERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Adriana Márcia Nicolau Korres
Instituto Federal do Espírito Santo – IFES
Examinadora Externa

Prof. Dr. Ing. Ricardo Franci Gonçalves
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Examinador Interno

Dr. Paulo Wagner Antunes
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Co-orientador

Prof. Dr. Sérvio Tulio Alves Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Orientador

Vitória, ____ de junho de 2019.

“A natureza é grande nas coisas grandes e
grandíssima nas pequeninas.”

Bernardin de Saint-Pierre

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por todo o apoio durante os momentos mais difíceis, graças a vocês eu pude superá-los.

Agradeço aos amigos, colegas e toda equipe do Labsan, que tornaram os meus dias no laboratório mais divertidos e interessantes, serei eternamente grata pela nossa troca de experiências e aprendizado. Lembrarei de todos com muito carinho.

Agradeço aos professores do PPGEA por todo o conhecimento passado ao longo desta jornada, sem o qual nada disso seria possível. Em especial ao professor Sérgio Túlio, que me concedeu a honra e a oportunidade de participar deste projeto de pesquisa e me permitiu conhecer as diversas vantagens no uso de microalgas em processos de biorremediação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Microalgas no tratamento de efluentes sanitários	18
3.2 Condições de cultivo	20
3.3 Parâmetros de avaliação de crescimento	23
3.4 Assimilação e equilíbrio do carbono inorgânico (C _i) no cultivo de microalgas	26
3.5 Fontes alternativas de CO ₂	29
4 METODOLOGIA.....	33
4.1 Definição do local de estudo.....	33
4.2 Cepa de microalga e meio de cultura	33
4.3 Inóculo e condições de cultivo	34
4.4 Ensaios Preliminares	35
4.5 Avaliação da suplementação de C _i no crescimento da biomassa microalgácea	36
4.5.1 Avaliação da correção do pH inicial com CO ₂ em cultivos suplementados com carbonatos	36
4.5.2 Avaliação de diferentes concentrações de fontes sólidas de C _i no crescimento de <i>Chlorella</i> sp.....	37
4.5.3 Avaliação de diferentes fontes de C _i no cultivo de microalgas	38
4.6 Métodos analíticos	39
4.6.1 Análise do crescimento.....	39
4.6.2 Análise da disponibilidade e utilização de carbono inorgânico dissolvido	41
4.6.3 Análise de carbono orgânico total (COT).....	42
4.6.4 Análise da razão SV/ST da biomassa	43

4.6.5	Análises estatísticas	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Ensaio preliminares	44
5.2	Correção do pH inicial com CO ₂ e seus efeitos.....	48
5.3	Resposta do crescimento de <i>Chlorella</i> sp. a diferentes concentrações de fontes sólidas de Ci	55
5.4	Avaliação de diferentes fontes de suplementação de Ci no cultivo de microalgas	61
6	CONCLUSÕES	70
7	RECOMENDAÇÕES	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva de crescimento de microbiano em regime de batelada com base no logaritmo natural da concentração de células (y) por unidade de tempo (x), indicando as fases lag (I); exponencial (II); estacionária (III); e de morte (IV). Adaptado de Maier (2009)..... 24
- Figura 2.** Equilíbrio das espécies de carbono inorgânico dissolvido em água doce e salgada a 25°C. Água doce: linha sólida, pK_{a1} = 6.35, pK_{a2} = 10.33. Água salgada: linha tracejada, pK_{a1} = 6.00, pK_{a2} = 9.10. dCO_2 = azul; HCO_3^- = vermelho; CO_3^{2-} = verde. Fonte: Adaptado de Baba & Shiraiwa, 2012. 26
- Figura 3.** Um modelo esquemático geral do mecanismo de concentração de carbono nas células de algas mostrando a absorção, conversão, acúmulo e transformação do carbono inorgânico. Fonte: Adaptado de Singh et al. (2016). 29
- Figura 4.** Foto em microscópio ótico com aumento de 100x mostrando cepa de *Chlorella* sp. (L06) isolada de efluente sanitário (A) e o consócio de microalgas proveniente de lagoa de alta taxa (B). Fonte: Autor. 34
- Figura 5.** Condições de cultivo em batelada, com auxílio da bandeja magnética para aplicação da mistura completa. Fonte: Autor..... 35
- Figura 6.** Leitura dos parâmetros de clorofila in vivo, densidade optica (OD680) e intensidade luminosa (PPFD) em meio efluente contendo a mesma concentração de inóculo e diferentes concentrações de $CaCO_3$ 47
- Figura 7.** Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella* sp. cultivada em diferentes concentrações de $NaHCO_3$ (A) e $CaCO_3$ (B)..... 49
- Figura 8.** Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella* sp. cultivada em diferentes concentrações de $NaHCO_3$ (A) e $CaCO_3$ (B) com correção do pH inicial..... 50
- Figura 9.** Concentrações iniciais de C dissolvido na forma de carbonatos ($C-CO_3$) e bicarbonatos ($C-HCO_3$) nos ensaios sem (colunas da esquerda) e com (colunas da direita) correção do pH inicial do meio efluente suplementado com diferentes concentrações de $CaCO_3$ (A) e $NaHCO_3$ (B). Fonte: Autor..... 53

Figura 10. Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella* sp. cultivada em meio efluente com diferentes concentrações de NaHCO_3 e CaCO_3 . Fonte: Autor. 56

Figura 11. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do experimento em mg/L para os ensaios com diferentes concentrações de NaHCO_3 . Fonte: Autor. 59

Figura 12. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do experimento em mg/L para os ensaios com diferentes concentrações de CaCO_3 . Fonte: Autor. 60

Figura 13. Crescimento de *Chlorella* sp. baseado no número de células e teor de clorofila in vivo ao longo do cultivo sob diferentes fontes de carbono inorgânico. EFN = Efluente Anaerobio (controle); EFN + Na 0,20% = Adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = Adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = Aeração 12hs/dia. Fonte: Autor. 61

Figura 14. Concentração de carbono na forma de carbonatos (C-CO_3) e bicarbonatos (C-HCO_3) nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 do cultivo de *Chlorella* sp. sob diferentes fontes de carbono inorgânico. Os valores acima das colunas representam o pH no momento da amostragem. Fonte: Autor. 63

Figura 15. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do cultivo de *Chlorella* sp. (L06) com diferentes fontes de carbono inorgânico em efluente anaeróbico. EFN = Efluente Anaerobio (controle); EFN + Na 0,20% = Adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = Adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = Aeração 12hs/dia. Fonte: Autor. 65

Figura 16. Crescimento de inóculo misto baseado no número de células e teor de clorofila in vivo ao longo do cultivo sob diferentes fontes de carbono inorgânico, onde: EFN = efluente anaerobio (controle); EFN + Na 0,20% = adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = aeração 12hs/dia. Fonte: Autor. 66

Figura 17. Concentração de carbono dissolvido na forma de carbonatos e bicarbonatos nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 do cultivo de inóculo misto sob diferentes fontes de carbono inorgânico. Os valores acima das colunas representam o pH no momento da amostragem. Fonte: Autor. 68

Figura 18. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{máx}$) ao final do cultivo de inóculo misto, proveniente de lagoa de alta taxa, com diferentes fontes de carbono inorgânico em efluente anaeróbio. EFN = efluente anaeróbio (controle); EFN + Na 0,20% = adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = aeração 12hs/dia. Fonte: Autor. 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias dos resultados da caracterização físico-química do meio efluente filtrado utilizado durante o período de experimentos (n=10). Fonte: Autor. 34

Tabela 2. Concentrações das fontes sólidas de carbono inorgânico (Ci) utilizadas em miliMolar (mM) e gramas/litro (g/L). Fonte: Autor. 37

Tabela 3. Cálculo das concentrações de carbonatos e bicarbonatos. Onde F = Alcalinidade à fenolftaleína e T = Alcalinidade total. Fonte: APHA (2005). 41

Tabela 4. Valores iniciais de pH e carbono inorgânico dissolvido (Ci_d) nos ensaios sem e com correção do pH inicial em cultivo de *Chlorella* sp. com diferentes concentrações de CaCO₃, os valores de ΔC representam o incremento na concentração de Ci_d para as diferentes concentrações avaliadas. 51

Tabela 5. Valores iniciais de pH e carbono inorgânico dissolvido (Ci_d) nos ensaios sem e com correção do pH inicial em cultivo de *Chlorella* sp. com diferentes concentrações de NaHCO₃, os valores de ΔC representam o incremento na concentração de Ci_d para as diferentes concentrações avaliadas. 52

Tabela 6. Variação na concentração de carbono inorgânico dissolvido (ΔC) e concentração da biomassa (B_{máx}) ao final do cultivo de *Chlorella* sp. sob diferentes concentrações de NaHCO₃. Fonte: Autor. 58

Tabela 7. Variação na concentração de carbono inorgânico dissolvido (ΔC) e concentração da biomassa (B_{máx}) ao final do cultivo de *Chlorella* sp. sob diferentes concentrações de CaCO₃. Fonte: Autor. 58

RESUMO

O uso de fontes sólidas de carbono inorgânico foi avaliado através da utilização de NaHCO_3 e CaCO_3 no cultivo de *Chlorella* sp. em efluente de tratamento anaeróbico de esgoto sanitário. A correção do pH através do borbulhamento de CO_2 nos tratamentos com CaCO_3 evitou os efeitos negativos gerados pelo aumento do pH com a adição do reagente e levou à fixação de CO_2 no meio, aumentando em até 201% a quantidade de carbono inorgânico disponível. Os resultados máximos de taxa de crescimento e produtividade foram obtidos com o uso de 2,0 g/L de NaHCO_3 ($0,53 \text{ d}^{-1}$ e $66,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e 1,19 g/L de CaCO_3 ($0,54 \text{ d}^{-1}$ e $67,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). O uso das fontes sólidas proporcionou uma taxa de crescimento 2,0 vezes maior e produtividade 1,8 vezes maior quando comparados ao controle sem fontes adicionais de carbono, além de gerarem um incremento na % de sólidos voláteis da biomassa, com resultados 21% e 20% maiores com o uso do NaHCO_3 e CaCO_3 , respectivamente. A utilização das fontes sólidas nas concentrações ótimas encontradas proporcionou um aumento no crescimento de *Chlorella* sp. equivalente a utilização da aeração 12h/dia, com resultados semelhantes de concentração máxima e % SV da biomassa, enquanto que o consórcio de microalgas avaliado não apresentou aumento significativo no crescimento para nenhuma das formas de suplementação aplicadas. A utilização de fontes sólidas de carbono inorgânico na forma de bicarbonatos pode se tornar uma alternativa a suplementação de CO_2 em cultivos de microalgas, uma vez que o carbono nesta forma é estável em meio líquido, reduzindo perdas para a atmosfera. Devido a elevação no pH, o uso do CaCO_3 somente mostrou ser viável através da correção do pH inicial e o borbulhamento de CO_2 permitiu sua fixação no meio alcalino. Maiores estudos com consórcios de microalgas utilizando diferentes concentrações e combinações de fontes de carbono podem trazer novas alternativas para a otimização na produção de biomassa tratando efluentes sanitários, aumentando a eficiência no uso de CO_2 em cultivos de microalgas.

ABSTRACT

The use of solid sources of inorganic carbon (NaHCO_3 and CaCO_3) as CO_2 supplementation was evaluated in the growth of *Chlorella* sp. with effluent from the anaerobic treatment of sewage. The correction of the pH through CO_2 bubbling in CaCO_3 treatments avoided the negative effects generated by the increase in pH with the addition of the reagent, and contributed to the CO_2 fixation in the medium – increasing the amount of available inorganic carbon up to 201%. The maximum growth rate and productivity were achieved using 2.0 g/L of NaHCO_3 (0.53 d^{-1} and $66.1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and 1.19 g/L of CaCO_3 (0.54 d^{-1} and $67.5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). The use of solid sources of inorganic carbon increased the growth rates and biomass productivities of *Chlorella* sp. cultures by a factor of 2.0 and 1.8, respectively, when compared to treatments without additional carbon sources. Additionally, an increase in the volatile solids content of the biomass was noted, which consisted in 21% for NaHCO_3 and 20% for CaCO_3 . On the other hand, treatments that received no solid carbon sources but had aeration 12 h/day displayed similar results when compared to the solid carbon treatments, regarding growth rate, maximum biomass concentration and percentage of volatile solids in the biomass. Nevertheless, the microalgae consortium did not present significant increase in growth for any of the forms of supplementation applied. The use of solid sources of inorganic carbon in the form of bicarbonates can be an alternative to gaseous CO_2 supplementation in microalgae cultures, since the carbon in this form is stable in liquid medium, reducing losses to the atmosphere. Due to the increase in pH, the use of CaCO_3 is only viable in case the correction of the initial pH is performed. In this case, the use of CO_2 bubbling is advantageous since it allows its fixation in the alkaline medium. Further studies with microalgae consortia using different concentrations and combinations of carbon sources may bring new alternatives for the optimization of biomass production with effluents from sewage treatment and improve the efficient use of CO_2 in microalgae cultures.

1 INTRODUÇÃO

Água e energia são bens essenciais para o desenvolvimento humano e sua demanda tem aumentado em escala exponencial ao longo dos anos. O crescimento populacional gerou uma crescente degradação e demanda de recursos hídricos, os quais têm sua oferta reduzida; tanto devido a alteração de regimes pluviais pelo aquecimento global (AVISO *et al.*, 2015) quanto pela redução em sua qualidade com o lançamento de resíduos agrícolas, domésticos e industriais sem tratamento adequado em corpos d'água, levando a contaminação e eutrofização destes ambientes (GOODDY *et al.*, 2016).

A combinação destes fatores leva a busca de sistemas de tratamento cada vez mais eficientes, visando o melhor aproveitamento e a redução do gasto energético. Alguns exemplos já existentes podem ser destacados como os Reatores Anaeróbios, amplamente utilizados em estações de tratamento, pois além de reduzirem a carga orgânica do esgoto, geram energia na forma de biogás. Porém, estes sistemas não são eficientes na remoção de nutrientes do efluente, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), elementos chave nos processos de eutrofização e que devem ser removidos antes do lançamento em corpos d'água (CHERNICHARO *et al.*, 2001).

Nitrogênio e fosforo são os principais nutrientes necessários para o crescimento de matéria prima vegetal. As microalgas assimilam estes nutrientes em grandes quantidades para crescimento e sua biomassa é considerada a matéria prima vegetal mais promissora em termos de aproveitamento energético. Esta classe de biomassa possui alta eficiência fotossintética e a maior produtividade autotrófica por área dentre todos os cultivares. Além disso apresenta vantagem em relação a plantas superiores por não utilizarem áreas úteis para cultivo de alimentos em sua produção, inclusive podendo ser cultivada em efluentes de tratamento de esgoto como fonte de água e nutrientes (SUGANYA *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2015). O cultivo de microalgas nestes efluentes oferece uma opção de tratamento terciário, através da remoção de

nutrientes e da redução do potencial de eutrofização dos corpos d'água onde serão lançados (PERAZZOLI *et al.*, 2016).

Além de nutrientes, as microalgas utilizam o carbono inorgânico preferencialmente na forma de dióxido de carbono (CO_2) para realizar a fotossíntese e convertê-lo em biomassa. Porém, as trocas gasosas do meio líquido com a atmosfera são insuficientes para se atingirem concentrações suficientes de CO_2 e taxas máximas de crescimento. Desta forma, a inserção de fontes de carbono inorgânico em cultivos de microalgas em efluentes tem sido estudada com objetivo de otimizar a produção de biomassa (SINGH *et al.*, 2016).

Uma das estratégias é fornecer o dióxido de carbono presente em altas concentrações nos gases de combustão, borbulhando em cultivos de microalgas para ser fixado na biomassa, reduzindo as emissões de CO_2 para a atmosfera. Porém, dificilmente há disponibilidade de área suficiente para cultivo próximo às fontes emissoras, fazendo com que haja a necessidade do transporte dos gases até o local (ZAWAR *et al.*, 2016). O custo de compressão do CO_2 foi calculado em US\$8.48/t de CO_2 e mais US\$3.30/t de CO_2 de custo com encanamento a cada 100km de distância (KADAM, 1997).

Outro obstáculo está na natureza físico-química do carbono inorgânico em meio aquoso. A conversão fotossintética do CO_2 em biomassa pode ser ineficiente devido à baixa taxa de dissolução do CO_2 em água. Consequentemente, o borbulhamento do CO_2 gasoso no cultivo em larga escala é mais propenso a resultar na liberação de mais CO_2 para a atmosfera do que é fixado pelo processo de fotossíntese (ZAWAR *et al.*, 2016).

A fixação de CO_2 em meio líquido pode ser potencializada através de aplicação de fontes sólidas de óxidos metálicos (Ex: CaO , Na_2O). Estes óxidos, em água, formam radicais hidroxilas (OH^-) capazes de aumentar a dissolução de CO_2 inserido, principalmente na forma de íons bicarbonatos, resultando na formação de sais de bicarbonatos (Ex: NaHCO_3 , CaHCO_3) (ZAWAR *et al.*, 2016; BONAVENTURA *et al.*, 2017; BONAVENTURA *et al.*, 2018).

Através de enzimas e transportadores de membrana específicos, as microalgas são capazes assimilar íons bicarbonatos (HCO_3^-) do meio e convertê-los em CO_2 (SINGH *et al.*, 2016; BABA & SHIRAIWA, 2012). O carbono inorgânico nestas formas é estável, armazenável e pode ser assimilado pela biomassa, podendo ser obtido facilmente através de compostos químicos amplamente comercializados como o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) ou através de resíduos de indústrias de papel e celulose como o carbonato de cálcio (CaCO_3).

Como uma alternativa, a conversão e utilização do CO_2 na forma de carbonatos e bicarbonatos pode se apresentar como uma solução eficiente. Por serem estáveis em meio líquido, armazenáveis e potencializarem a quantidade de carbono inorgânico disponível, fontes sólidas de carbono podem se tornar uma alternativa para a suplementação de meios líquidos utilizados no cultivo de microalgas. Através da otimização da produção de biomassa, seu uso pode oferecer uma opção economicamente viável para crescimento de microalgas aplicadas no tratamento de efluentes. Desta forma, neste estudo foram analisadas microalgas cultivadas em efluentes sanitários e os efeitos da suplementação com fontes sólidas de carbono inorgânico foram investigados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com fontes sólidas de carbono inorgânico no crescimento de microalgas em efluente anaeróbio de tratamento de esgoto sanitário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da correção do pH inicial com CO₂ (99%) no cultivo de *Chlorella* sp. suplementado com fontes sólidas de carbono inorgânico;
- Analisar o efeito de diferentes concentrações de fontes sólidas de carbono inorgânico no crescimento de *Chlorella* sp. em efluente anaeróbio;
- Comparar o crescimento de *Chlorella* sp. suplementada com fontes sólidas e convencionais (aeração) de carbono inorgânico em efluente anaeróbio;
- Avaliar o crescimento de um consórcio de microalgas em efluente anaeróbio, suplementado com diferentes fontes de carbono inorgânico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microalgas no tratamento de efluentes sanitários

Com o aumento da produção agrícola, urbanização e industrialização, os resíduos gerados por estas atividades se tornaram um problema ambiental devido ao contínuo e crescente lançamento de águas residuárias no meio ambiente sem tratamento adequado (GONÇALVES *et al.*, 2017; GOODDY *et al.*, 2016; RAWAT *et al.*, 2011; ASLAN & KAPDAN, 2006). A eutrofização é um processo desencadeado pela elevação da concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, o que provoca um aumento da produtividade primária do corpo hídrico e o desenvolvimento de blooms de algas e plantas aquáticas, com posterior esgotamento do oxigênio e redução da biodiversidade local (RENUKA *et al.*, 2013; CAI *et al.*, 2013; SMITH & SCHINDLER, 2009). Portanto, existe a necessidade do tratamento de efluentes através de métodos que sejam capazes de remover também nitrogênio e fósforo de forma eficiente, antes do seu lançamento no meio ambiente.

Segundo os últimos dados do ano de 2015, o Brasil teve 50,3% de seu esgoto coletado sendo que destes, 74% receberam tratamento, o que significa que apenas 42,7% do esgoto produzido nacionalmente recebeu algum tipo de tratamento antes de seu lançamento no meio ambiente (BRASIL, 2017). A partir de 2011 a legislação brasileira flexibilizou alguns limites para lançamento de efluentes com o estabelecimento da atual Resolução CONAMA Nº 430/2011. Para lançamento de efluentes provenientes de tratamento sanitário, parâmetros como fósforo e nitrogênio total não foram incluídos, deixando cada estado responsável pela sua possível inclusão (BRASIL, 2011) para melhor refletir a realidade local. A razão da flexibilização da nova legislação foi a de possibilitar a implementação de sistemas mais simples e menos eficientes de tratamento como os Reatores Anaeróbios de Manta de Lodo (UASB), com o objetivo de que, futuramente, os melhoramentos nos sistemas de tratamento resultem em efluentes com melhor qualidade (SPERLING, 2016). As diversas características favoráveis dos sistemas anaeróbios como o baixo custo de operação, baixa

geração de lodo, além da produção de energia na forma de biogás e aliado às condições ambientais favoráveis do país, tem feito com que estes sistemas sejam amplamente difundidos no Brasil e ocupem uma posição de destaque, particularmente os reatores UASB, não sendo eficientes, porém, na remoção de nutrientes, fazendo-se necessário o pós-tratamento do efluente gerado (CHERNICHARO *et al.*, 2001).

Os sistemas de tratamento de águas residuárias são essencialmente divididos em três etapas, com a remoção de nutrientes sendo normalmente realizada na terceira etapa (GONÇALVES *et al.*, 2017). A primeira etapa chamada tratamento primário é responsável pela remoção de sólidos suspensos do efluente através de processos físico-químicos, após esta fase o efluente deverá estar livre da maior parte de sólidos grosseiros e matéria orgânica em suspensão (RAZZAK *et al.*, 2017; HEMALATHA & MOHAN, 2016), restando a matéria orgânica biodegradável que poderá ser removida na segunda etapa. O tratamento secundário é responsável pela remoção da matéria orgânica dissolvida no efluente, isto é realizado através de tratamento microbiológico em sistemas onde a matéria é decomposta por microrganismos tanto por via aeróbia (ex.: lagoas aeradas) ou anaeróbia (ex.: reatores fechados) (RAZZAK *et al.*, 2017). O tratamento terciário é responsável pela remoção da matéria orgânica restante, desinfecção e remoção de nutrientes, também chamado de tratamento avançado e pode ser realizado através de processos químicos, físicos ou biológicos (RAZZAK *et al.*, 2017; HEMALATHA & MOHAN, 2016)

As microalgas vêm sendo introduzidas como uma solução economicamente viável para o tratamento terciário de águas residuárias por apresentarem uma série de benefícios, visto que estes microrganismos consomem grandes quantidades de nitrogênio e fósforo para seu crescimento, com estudos apontando remoções de 80-100% destes nutrientes (ARIAS *ET AL.*, 2018; PASSOS *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2016; SUKAČOVÁ *et al.*, 2015). Microalgas possuem alta produtividade por unidade de área e sua biomassa pode ser recuperada para reciclagem de nutrientes ou extração de produtos

como pigmentos de alto valor e produção de biocombustíveis (ARIAS *et al.*, 2018; HEMALATHA & MOHAN, 2016; RAZZAK *et al.*, 2017; GOLÇALVES *et al.*, 2017). A utilização de microalgas para produção de biodiesel tem sido amplamente investigada devido ao alto conteúdo lipídico de algumas espécies, podendo equivaler a até 70% do seu peso seco (MEDIPPALY *et al.*, 2015).

No Brasil a alta radiação solar favorece sistemas de tratamento baseados na atividade fotossintética, com a aplicação de microalgas sendo realizada principalmente na forma de lagoas de estabilização que juntamente com os reatores anaeróbios são os sistemas de tratamento mais amplamente utilizados no país (SPERLING, 2016). O efluente pré-tratado em um reator UASB tem características vantajosas para o cultivo de microalgas como a baixa turbidez, o que facilita a penetração da luz na coluna líquida necessária para a fotossíntese (CAVALCANTI *et al.*, 2001), além disso as concentrações médias de nitrogênio e fósforo total deste tipo de efluente no Brasil são de 48 e 6 mg/L respectivamente (SPERLING, 2016), o que significa uma proporção molar média destes nutrientes de 17:1, valor próximo da razão média em microalgas proposta por Redfield (1958) (16:1 de nitrogênio e fósforo respectivamente). A baixa carga orgânica de efluentes UASB evita que haja a excessiva atividade de bactérias e acidificação do meio devido a produção de gás carbônico, ao contrário, a atividade fotossintética prevalece sobre a oxidação bacteriana, consumindo CO₂ do meio e provocando a elevação do pH, fazendo com que haja remoção de nutrientes também por vias físico-químicas como a volatilização da amônia e precipitação de fosfatos na forma de sais de cálcio ou apatita (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

3.2 Condições de cultivo

Fatores abióticos, como luminosidade, temperatura, concentração de nutrientes, concentração de CO₂ e O₂, pH, salinidade e substâncias tóxicas; ou

bióticos, como a presença de patógenos, predação e competição entre espécies; irão influenciar o desempenho do crescimento fotoautotrófico de microalgas (BAHADAR & KHAN, 2013), de forma que uma mesma espécie pode apresentar perfis de crescimento distintos de acordo com as condições de cultivo às quais for exposta.

Dentre os principais nutrientes necessários às microalgas, nitrogênio e fósforo são os exigidos em maior quantidade. As microalgas assimilam preferencialmente o nitrogênio na forma de amônio (NH_4^+), podendo também utilizar o nitrato (NO_3^-) e a uréia, enquanto que altas concentrações do íon amônio se tornam tóxicas em pHs elevados (>9.3) devido a sua conversão em amônia (NH_3) (EUSTANCE *et al.*, 2013). O fósforo é assimilado pelas microalgas na forma de ortofosfato (PO_4^{3-}), podendo ser estocado quando em excesso na forma de grânulos de polifosfato dentro das células para serem usados posteriormente para crescimento (RAZZAK *et al.*, 2017). A fórmula estequiométrica geral para a composição da biomassa de microalgas é $\text{C}_{106}\text{H}_{181}\text{O}_{45}\text{N}_{16}\text{P}$, baseada na razão de Redfield (ROGERS *et al.*, 2014). A proporção destes elementos deve se refletir no meio de cultivo para permitir condições ótimas de crescimento, indicando que, geralmente, o carbono assume o papel de elemento limitante (LIN & WU, 2015).

A escassez de nutrientes como o nitrogênio pode afetar a composição da biomassa elevando sua porcentagem em carbono. Na deficiência de nitrogênio, a célula reduz os processos de divisão celular enquanto a produção de compostos de armazenamento de energia são mobilizados, aumentando a fixação de carbono e convertendo o excesso em lipídios e carboidratos, onde o uso do carbono fixado é convertido de síntese de proteínas e lipídios polares para carboidratos e óleos estocados no interior da célula (SAJJADI *et al.*, 2018). A condição de crescimento em deficiência de nutrientes é geralmente utilizada em cultivos em batelada, onde as células crescem em um ambiente repleto de nutrientes e a medida que a taxa de crescimento e densidade celular aumentam, ocorre a depleção de nutrientes, até que a taxa de crescimento e fotossíntese reduzem enquanto compostos de armazenamento de energia aumentam. Esta

condição pode ser benéfica e é utilizada em cultivos que possuem como objetivo crescimento de biomassa para produção de biocombustíveis, visto que uma maior concentração de carbono na forma de lipídios e carboidratos e menor conteúdo protéico são desejados.

A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos, sendo ideais temperaturas em torno de 20 a 30°C para cultivo de espécies tropicais de microalgas (TORRES, 2014). A luminosidade afeta diretamente a atividade fotossintética e sua aplicação será uma combinação de intensidade e tempo de exposição (fotoperíodo). Uma maior intensidade luminosa pode acarretar tanto em maiores quanto menores taxas de crescimento devido a danos causados ao fotossistema, quando estes ocorrem em velocidade maior do que são reparados (STRAKA & RITTMANN, 2018). Fontoura *et al.* (2017) obteve maior concentração de biomassa e remoção de nutrientes cultivando *Scenedesmus* sp. em efluente utilizando uma intensidade luminosa de $182.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 12h/dia. Em regimes de batelada a utilização de um fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro é considerado mais adequado para a otimização da produtividade de microalgas (TAKESHITA *et al.*, 2014). Enquanto o excesso de luz pode causar fotoinibição, o aumento na concentração celular durante o crescimento pode causar sombreamento, limitando a disponibilidade de luz e as taxas de crescimento (TORRES, 2014).

Valores de pH próximos a neutralidade (pH 7,0) são preferíveis pela maior parte das microalgas (TORRES, 2014), porém o pH irá variar naturalmente durante o crescimento (caso nenhuma forma de controle seja aplicada) devido a atividade de fotossíntese e respiração celular. Em cultivos fotoautotróficos as microalgas utilizam gás carbônico (CO_2) e íons H^+ do meio para realizar a fotossíntese, logo, o decréscimo na concentração de H^+ leva ao aumento do pH como consequência da atividade fotossintética (CHI *et al.*, 2011). Na ausência de luz ocorre a respiração celular, onde há liberação de CO_2 para o meio e formação de bicarbonatos (HCO_3^-) e H^+ , ocasionando uma queda de pH durante o período noturno (CASSINI *et al.*, 2017). O pH está intimamente relacionado com o equilíbrio das formas de carbono inorgânico no meio, podendo atuar como

um fator limitante para a fixação fotossintética de CO₂, uma vez que em pHs elevados (>10,4) a maior parte do carbono está disponível na forma de carbonatos (CO₃²⁻) dificilmente assimilados pela biomassa (BABA & SHIRAIWA, 2012).

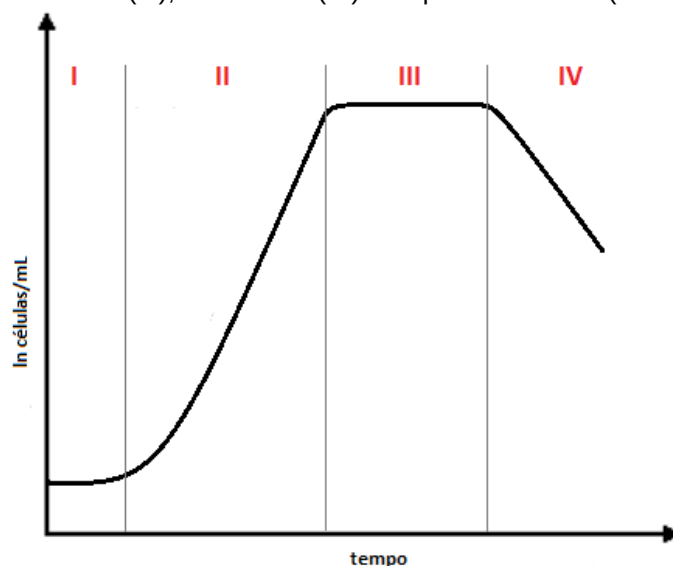
3.3 Parâmetros de avaliação de crescimento

O crescimento microbiano é identificado pelo incremento na biomassa de determinado microrganismo. Havendo disponibilidade de nutrientes, carbono e condições necessárias, haverá duplicação celular a uma velocidade constante promovendo o crescimento exponencial até que haja algum fator limitante. A taxa de crescimento (μ) de um microrganismo é uma forma de expressar esta velocidade através do aumento em porcentagem fixa de um total por unidade de tempo (WOOD et al., 2005), ou seja, em quantas vezes a biomassa é incrementada por intervalo de tempo. Para qualquer estimativa de taxas de crescimento é necessário a coleta de dados que representem a quantidade de biomassa durante o intervalo que se deseja avaliar. Quando o objetivo do estudo é estimar as taxas de crescimento populacional, a contagem do número de células deve ser realizada uma vez que leva em consideração o número de células individuais em uma população, enquanto que a biomassa (peso seco) pode ser utilizada quando deseja-se calcular a taxa de crescimento no sentido simples de acréscimo de material. Além dos parâmetros diretos de quantificação da biomassa, parâmetros indiretos de quantificação também podem ser utilizados para avaliar o crescimento como conteúdo de clorofila, conteúdo de nitrogênio orgânico e densidade óptica, desde que apresentem previamente uma correlação linear com o número de células ou biomassa (WOOD et al., 2005).

Segundo Maier (2009), o crescimento de microalgas em regime de batelada é representado por uma curva de crescimento contendo quatro fases principais (fig. 1). A primeira fase é chamada fase lag (I), onde há a aclimação das células ao meio de cultivo após a inoculação. A segunda fase é chamada de fase exponencial (II), onde as células passam a se dividir em velocidade máxima e

constante e onde pode-se calcular as taxas de crescimento (μ), assumindo que a taxa de mortalidade (m) é zero. A terceira fase é chamada de estacionária (III), onde a taxa de crescimento é igual a taxa de mortalidade e a concentração celular permanece constante. A quarta fase é chamada fase de morte ou declínio (IV), onde a taxa de mortalidade supera a taxa de crescimento e a concentração celular começa a decair indicando que o meio não suporta mais o crescimento microbiano.

Figura 1. Curva de crescimento de microbiano em regime de batelada com base no logaritmo natural da concentração de células (y) por unidade de tempo (x), indicando as fases lag (I); exponencial (II); estacionária (III); e de morte (IV). Adaptado de Maier (2009).



A taxa de crescimento μ é expressa pela equação $\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / \Delta t$, onde N_0 é a concentração celular no tempo inicial, N_t a concentração celular no tempo t , e Δt o intervalo de tempo. O cultivo em regime de fluxo contínuo é caracterizado pela adição contínua de meio ao sistema de cultivo enquanto a mesma quantidade em volume de cultura é removida, fazendo com que o volume e a concentração celular no sistema permaneçam constantes. O objetivo deste sistema é manter um crescimento exponencial contínuo através da reposição de meio e manutenção das condições ótimas de crescimento, elevando a

produtividade, fixação de CO₂ e remoção de nutrientes (WOOD *et al.*, 2005). Se considerarmos que a concentração celular do sistema é constante, a taxa de crescimento μ será igual a taxa de diluição (D), onde D equivale à razão entre a vazão volumétrica e o volume da cultura.

A densidade óptica (DO) é utilizada como uma forma rápida de medir a concentração de biomassa em suspensão, sendo a forma de medida indireta mais comum em laboratórios de microbiologia para avaliar o crescimento microbiano e pode ser correlacionada com a concentração celular de acordo com a Lei de Beer-Lambert (MYERS *et al.*, 2013). A espectrofotometria é um método de quantificação da DO que avalia capacidade que uma amostra tem de absorver a luz em um determinado comprimento de onda expresso na forma de valores de absorbância. Myers *et al.* (2013) demonstrou que embora as especificações e a sensibilidade do espectrofotômetro ditem os valores máximos de absorbância que podem ser medidos, as diferenças na dispersão e absorbância da luz pelas partículas podem reduzir a faixa de absorbância útil em que se pode aplicar a lei de Beer-Lambert. O autor mediu valores de absorbância em diversos comprimentos de onda durante o cultivo de *Chlorella vulgaris* utilizando um espectrofotômetro com absorbância máxima de 4.0 e somente encontrou a linearidade da Lei de Beer-Lambert para valores de no máximo 1.0 (obtidos para os comprimentos de maior absorbância devido a presença de pigmentos fotossintetizantes, que incluem as regiões próximas a 440-nm e 680-nm), recomendando a diluição de amostras até uma absorbância de 0.5 e a utilização do sobrenadante da cultura como branco para melhores resultados de correlação com a biomassa em suspensão.

A fluorescência *in vivo* também é um parâmetro bastante utilizado como medida indireta do número de células ou biomassa. O parâmetro se baseia na fluorescência da clorofila após ser excitada pela luz emitida por um fluorímetro. Wood *et al.* (2005) discorre sobre o método e suas limitações, que passou a ser utilizado após um estudo que analisou o crescimento de diversos grupos de microalgas sobre uma ampla variedade de condições. O método assume que a medida da fluorescência de uma cultura em crescimento é linearmente

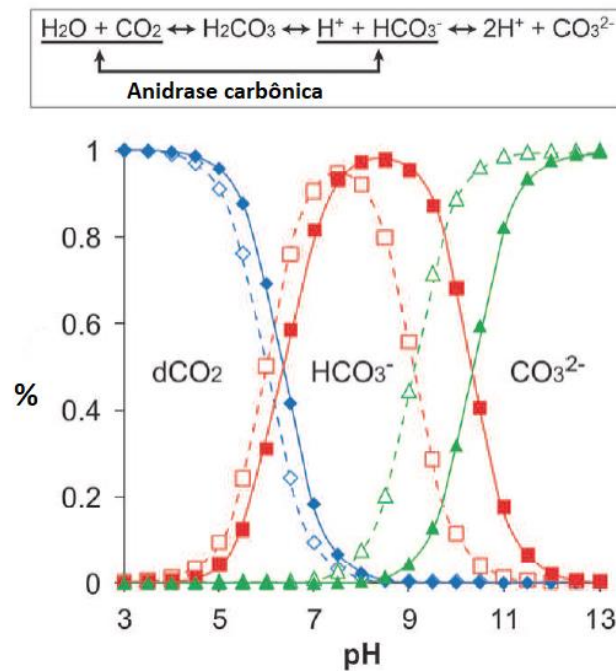
correlacionada ao número de células e pode ser detectada em diversas densidades celulares. O autor alerta que o método requer suspensões uniformes de microalgas, não sendo indicado para culturas com células muito aglomeradas ou que aderem a parede do recipiente, e também demonstra que pode ocorrer não-linearidade entre a fluorescência e número de células para momentos de elevada densidade celular dependendo da cultura e condições avaliadas, o que deve ser levado em consideração no momento da escolha do método.

3.4 Assimilação e equilíbrio do carbono inorgânico (Ci) no cultivo de microalgas

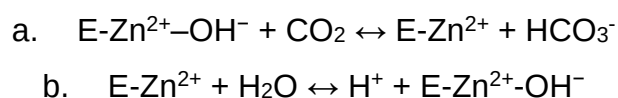
A habilidade das microalgas em utilizar o CO₂ como fonte de carbono teve início nos primórdios da evolução da vida na terra, quando a atmosfera era rica em gás carbônico e pobre em oxigênio (O₂) (ZHU *et al.*, 2017). A principal enzima que possibilitou a conversão do CO₂ para carbono orgânico é a RuBisCO (ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase), porém à medida que as concentrações de O₂ na atmosfera aumentaram e de CO₂ reduziram, o oxigênio se tornou um substrato competitivo devido a baixa afinidade da RuBisCO pelo CO₂ (SINGH *et al.*, 2016). Os organismos fotossintéticos desenvolveram um mecanismo de concentração de carbono (MCC) em resposta a estas mudanças para favorecer a absorção de CO₂, que envolve a enzima anidrase carbônica e transportadores de carbono inorgânico. Segundo Baba & Shiraiwa (2012), a concentração de CO₂ dissolvido (dCO₂) em uma solução aquosa se equilibra com a pressão da atmosfera de acordo com a Lei de Henry e o dCO₂ se dissocia em bicarbonato (HCO₃²⁻) e carbonato (CO₃²⁻) em um equilíbrio dependente do pH, concentração iônica e salinidade (Fig. 2).

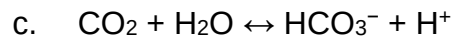
Figura 2. Equilíbrio das espécies de carbono inorgânico dissolvido em água doce e salgada a 25°C. Água doce: linha sólida, pKa1= 6.35, pKa2 = 10.33. Água salgada: linha tracejada, pKa1

= 6.00, pKa2 = 9.10. dCO₂ = azul; HCO₃⁻ = vermelho; CO₃²⁻ = verde. Fonte: Adaptado de Baba & Shiraiwa, 2012.



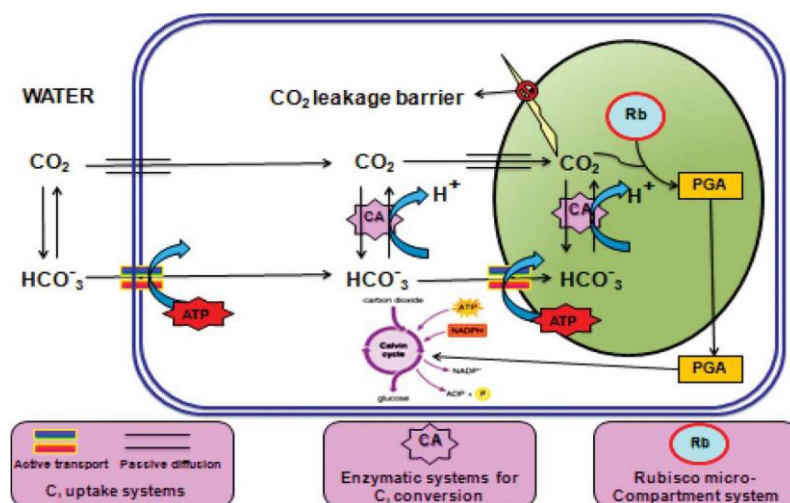
O íon HCO₃⁻ é a espécie dominante no pH fisiológico (entre 7 e 8), que é similar ao pH do estroma do cloroplasto. No entanto, a RuBisCO reage apenas com o CO₂ e a conversão do HCO₃⁻ em CO₂, nesta faixa de pH, é extremamente lenta quando comparada a atividade de fixação enzimática (BABA & SHIRAIWA, 2012). A ação da enzima anidrase carbônica (AC) acelera a taxa de desidratação e conversão do bicarbonato em CO₂, permitindo a sua utilização como substrato pela RuBisCO, elevando as taxas de fixação enzimática. Além disso, a enzima AC evita que o CO₂ absorvido pela célula seja perdido via difusão pela membrana celular (que possui alta permeabilidade ao CO₂), catalisando a sua hidratação e conversão em HCO₃⁻, forma em que é preferencialmente acumulado dentro da célula (CHI *et al.*, 2011). Badger (2003) explica o mecanismo enzimático da AC de acordo com a reação abaixo:





O sítio ativo da AC possui uma molécula de Zinco (Zn) ligada a uma hidroxila que ataca a molécula de CO_2 , convertendo-o em bicarbonato (a). O sítio então é regenerado através da ionização de uma molécula de água e liberação de um próton H^+ (b). A reação é reversível, com o consumo de H^+ do meio para conversão do HCO_3^- em CO_2 , e a reação geral é dada ao final (c). As microalgas são capazes de importar carbono inorgânico do meio passivamente, através da difusão do CO_2 pela membrana, ou ativamente através do transporte de íons HCO_3^- por transportadores de membrana, este processo leva a um acúmulo de C_i a níveis significativamente maiores que no meio extracelular (ZHU *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016). Além dos transportadores de membrana, microalgas possuem transportadores de C_i no cloroplasto responsáveis pela concentração de C_i ao redor da RuBisCO (SINGH *et al.*, 2016; WINK *et al.*, 2013; CHI *et al.*, 2011). Uma CA associada a RuBisCO é então responsável por converter rapidamente o HCO_3^- acumulado no interior do compartimento em CO_2 , o mecanismo geral é dado pela figura 3.

Figura 3. Um modelo esquemático geral do mecanismo de concentração de carbono nas células de algas mostrando a absorção, conversão, acúmulo e transformação do carbono inorgânico. Fonte: Adaptado de Singh et al. (2016).



Após a conversão do bicarbonato em CO_2 dentro do cloroplasto, o CO_2 é fixado em carbono orgânico pela Rubisco através da produção de duas moléculas de 3-fosfoglicerato (PGA). Estes ácidos orgânicos de 3 carbonos são então reduzidos, através de uma série de reações, aos açúcares que serão substrato para a produção de carboidratos e lipídios (SAYRE, 2010). Estes metabólitos podem atuar tanto como componentes estruturais da célula (ex.: parede celular) quanto como componentes de armazenamento de energia (amido e óleos), fornecendo energia para os processos metabólicos quando necessário.

3.5 Fontes alternativas de CO_2

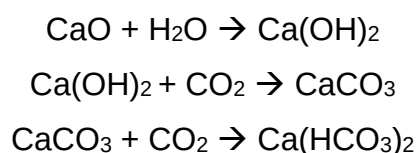
A velocidade das trocas gasosas do meio líquido com a atmosfera e a concentração de CO_2 atmosférico, 0,04% de acordo com NOAA (2018), não são suficientes para se atingirem taxas máximas de crescimento e produtividade no cultivo de microalgas (SINGH *et al.*, 2016; KLEIN *et al.*, 2018). Estudos demonstram que o borbulhamento de CO_2 em concentrações que variam de 2,0

a 5,3% proporcionaram melhores taxas de crescimento e remoção de nutrientes (NAYAK *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2016; HUSSAIN *et al.*, 2017). Gases de combustão podem ser recuperados de indústrias e utilizados como fonte de CO₂, reduzindo as emissões para a atmosfera, porém as altas concentrações de CO₂ são prejudiciais para a maioria das microalgas devido a inibição da anidrase carbônica (AC) e dos transportadores que participam do mecanismo de concentração de carbono (GUO *et al.*, 2017; HUSSAIN *et al.*, 2017). Além disso, o custo de compressão e transporte pode representar cerca de 30% do custo total do processo de recuperação (KADAM, 1997).

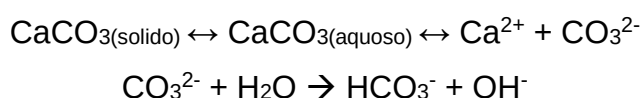
Devido à baixa solubilidade do CO₂ em água (cerca de 1,45 g/L a 25°C), as moléculas livres de CO₂ são facilmente perdidas para a atmosfera, fazendo necessário o bombeamento contínuo de CO₂ gasoso para garantir que carbono suficiente esteja disponível para ser utilizado durante a fotossíntese (LAM *et al.*, 2012). Meier *et al.* (2017) utilizou um fotobioreator aberto para purificação de biogás e observou que 19% do CO₂ foi fixado pela biomassa enquanto que a maior porcentagem de remoção (57%) foi através de perdas para atmosfera via dessorção. Consequentemente, o borbulhamento do CO₂ gasoso no cultivo em larga escala é mais propenso a resultar na liberação de mais CO₂ para a atmosfera do que é fixado fotossinteticamente (ZAWAR *et al.*, 2016).

O íon bicarbonato (HCO₃⁻), apesar de não difundir pela membrana celular, pode ser utilizado pelas microalgas através do transporte ativo e pela ação das enzimas ACs (CASSINI *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2016; LAM *et al.*, 2012). Pancha *et al.* (2015) obteve um aumento de 23% na produção de biomassa de *Scenedesmus* sp. utilizando 0.6 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃). *Dunaliella salina* apresentou taxa de crescimento específico 2.84 vezes maior utilizando 5g/L de NaHCO₃ (KIM *et al.*, 2017). Nayak *et al.* (2018) obteve valores máximos de taxa de crescimento específico (0.615 d⁻¹) e produtividade (530.1 mg L⁻¹ d⁻¹) para *Chlorella* sp. utilizando 0.5 g/L de NaHCO₃ juntamente com CO₂ a 1%, reduzindo os custos de US\$ 8,92 Kg⁻¹, quando apenas o NaHCO₃ foi usado como fonte de carbono, para US\$ 0,86 Kg⁻¹.

O CO₂ pode ser fixado de gases de combustão na forma de bicarbonato através da reação com uma solução de carbonato de cálcio (Na₂CO₃), formando NaHCO₃ (BONAVENTURA *et al.*, 2017; BONAVENTURA *et al.*, 2018), porém a quantidade de NaHCO₃ que pode ser adicionada ao meio de cultivo é limitada pela sua salinidade, devido ao acúmulo de Na⁺ (NAYAK *et al.*, 2018). Zawar *et al.* (2016) obteve maiores taxas de utilização de bicarbonato por *Chlorella sorokiniana* com CO₂ fixado na forma de bicarbonatos através de óxido de cálcio (CaO) do que com a adição direta de NaHCO₃, utilizando meio de cultivo com CaO para capturar CO₂ através da reação:



Zhao *et al.* (2016) observou um aumento na biomassa e eficiência de remoção de nutrientes para *Chlorella* sp., utilizando uma combinação de solução de Fe³⁺ e CaCO₃, onde o acúmulo de HCO₃⁻ foi promovido pelo equilíbrio de carbonatos e bicarbonatos no sistema através da reação:



Xie & Wu (2014) relataram que enquanto a solubilização do calcário [CaMg(CO₃)₂] pode elevar o crescimento de microalgas, o crescimento de microalgas também pode aumentar a solubilização do calcário devido a atividade de ACs na parte externa da membrana, que, ao promoverem a conversão do HCO₃⁻ em CO₂, aumentam a taxa da reação $\text{CaMg(CO}_3)_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + 4\text{HCO}_3^-$.

Além da redução nos custos de pressurização e transporte, a conversão e utilização do CO₂ na forma de bicarbonatos oferece diversas vantagens: (1) maior solubilidade, evitando perdas significativas de CO₂, (2) o CO₂ nestas formas é estável e armazenável, podendo ser estocado em períodos em que não há crescimento celular como o período noturno ou durante o inverno e (3) não há requerimento de energia para bombeamento (ZAWAR *et al.*, 2016; LAM *et al.*, 2012; CHI *et al.*, 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Definição do local de estudo

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas as dependências do Laboratório de Saneamento (LABSAN), no Centro Tecnológico do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, localizada no Campus Universitário de Goiabeiras, Vitória. Os ensaios foram realizados na Sala de Microbiologia, que conta com estante de cultivo adaptada para cultivo de microalgas e temperatura controlada.

4.2 Cepa de microalga e meio de cultura

A cepa de microalga *Chlorella* sp. L06 (Fig. 4) isolada de efluente sanitário foi fornecida pelo Laboratório de Saneamento Ambiental (LABSAN). O inóculo misto utilizado neste experimento foi coletado de uma lagoa de alta taxa operando em escala piloto dentro de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) em Araças (Vila Velha, ES), tratando esgoto municipal. O meio de cultivo utilizado para todos os experimentos descritos neste trabalho é um efluente anaeróbico de tratamento de esgoto sanitário, também fornecido pela ETE de Araças. Previamente a todos os ensaios, o efluente foi filtrado em fibra de vidro (GF-1 0,7µm) para remoção de sólidos suspensos e foi caracterizado de acordo com parâmetros físico-químicos, descritos na tabela 1.

Figura 4. Foto em microscópio ótico com aumento de 100x mostrando cepa de *Chlorella* sp. (L06) isolada de efluente sanitário (A) e o consócio de microalgas proveniente de lagoa de alta taxa (B). Fonte: Autor.

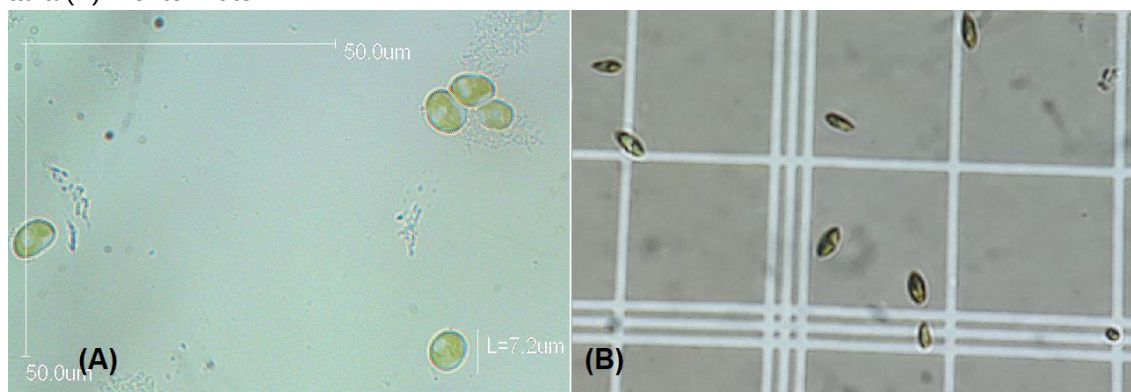


Tabela 1. Médias dos resultados da caracterização físico-química do meio efluente filtrado utilizado durante o período de experimentos (n=10). Fonte: Autor.

Parâmetro	Unidade	Valores	Metodologia
pH	----	7,22 ± 0,28	-
Alcalinidade total	mg de CaCO ₃ /L	287 ± 33	APHA - 2320 B (2005)
DQO	mg de O ₂ /L	61,4 ± 8,3	APHA - 5220 D (2005)
NTK	mg de N-NH ₄ ⁺ /L	44,9 ± 4,8	APHA - 4500 B (2005)
Nitrogênio Amoniacal	mg de N-NH ₃ /L	43,8 ± 5,1	APHA - 4500 C (2005)
Nitrato	mg de N-NO ₃ ⁻ /L	<1	Cromatografia iônica
Nitrito	mg de N-NO ₂ ⁻ /L	<1	Cromatografia iônica
Fósforo total	mg de P-PO ₄ ⁻ /L	3,14 ± 0,7	APHA - 4500 E (2005)
Fósforo dissolvido	mg de P-PO ₄ ⁻ /L	2,93 ± 0,7	APHA - 4500 E (2005)

4.3 Inóculo e condições de cultivo

Os inóculos foram cultivados em efluente anaeróbio até a fase exponencial de crescimento e depois transferidos para o meio de cultivo nas diferentes condições experimentais de forma que a concentração inicial de cada experimento foi equivalente a absorvância de 0.080 a 680nm (utilizando o meio como branco). Os experimentos foram incubados a uma temperatura média de 25 ± 2°C sob iluminação de 54 µmol m⁻² s⁻¹, com fotoperíodo de 12h claro: 12h escuro, até atingida a fase platô de crescimento. Os ensaios foram realizados em frascos de 300mL vedados com algodão hidrofóbico e gaze, contendo 250mL

de meio de cultivo, sob mistura completa utilizando bandeja de agitação e barras magnéticas (fig. 5). As amostras foram tomadas diariamente às 10 horas da manhã (± 30 min), realizando-se também o rodízio de posição dos frascos na bandeja uma vez ao dia.

Figura 5. Condições de cultivo em batelada, com auxílio da bandeja magnética para aplicação da mistura completa. Fonte: Autor.



4.4 Ensaios Preliminares

Para a escolha das concentrações de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e carbonato de cálcio (CaCO_3) como fontes sólidas de carbono inorgânico, a fração de carbono orgânico da biomassa foi calculada. Um inóculo da cepa de *Chlorella* sp. (L06) foi cultivado nas mesmas condições descritas no item 4.3 e seu crescimento foi acompanhado diariamente através da análise de clorofila *in vivo* e contagem de células até o início da fase estacionária. Ao final do cultivo, foram coletadas amostras para realização da análise de DQO da biomassa e quantificação de carbono orgânico conforme descrito no item 4.6.3. A estimativa do teor de carbono da biomassa e o histórico das características físico-químicas

do efluente utilizado foram utilizados para estimar a quantidade de carbono inorgânico necessária para se atingir uma concentração máxima de biomassa nas condições aplicadas. As concentrações dos reagentes foram então selecionadas com base nos resultados e em dados da literatura, de forma que concentrações maiores e menores de carbono inorgânico dissolvido fossem testadas a partir da concentração calculada.

Para avaliar a influência da turbidez gerada pelos carbonatos em suspensão na passagem da luz pelo meio de cultivo, a intensidade luminosa foi mensurada por luxímetro imerso no recipiente de cultivo contendo o mesmo volume de meio a ser utilizado nos ensaios com diferentes concentrações de CaCO_3 . A escolha dos parâmetros indiretos de avaliação de crescimento foi feita após a análise da interferência de carbonatos em suspensão nos valores de densidade óptica, no comprimento de onda de 680nm (DO680), e clorofila *in vivo* através da leitura dos parâmetros no meio efluente inoculado com *Chlorella* sp. L06 e com a adição de diferentes concentrações de CaCO_3 . Após a adição de cada concentração do reagente, foi aguardado um período de 10 minutos para reação sob agitação e em seguida tomadas as amostras para leitura dos parâmetros.

4.5 Avaliação da suplementação de C_i no crescimento da biomassa microalgácea

4.5.1 Avaliação da correção do pH inicial com CO_2 em cultivos suplementados com carbonatos

Para este teste foi avaliado o crescimento de *Chlorella* sp. exposta a três concentrações diferentes de dois reagentes selecionados: bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e carbonato de cálcio (CaCO_3). As concentrações utilizadas estão descritas na tabela 2 e foram selecionadas de acordo com dados da literatura e de forma que as mesmas concentrações molares, e consequentemente as

mesmas concentrações de carbono, sejam adicionadas para ambos os reagentes.

Tabela 2. Concentrações das fontes sólidas de carbono inorgânico (Ci) utilizadas em miliMolar (mM) e gramas/litro (g/L). Fonte: Autor.

Fonte de Ci	Unidade	Concentrações			
NaHCO ₃	g/L	0	0,25	0,50	1,00
	mM	0	2,9	5,9	11,9
CaCO ₃	g/L	0	0,29	0,59	1,19
	mM	0	2,9	5,9	11,9

A correção do pH através do uso de CO₂ como agente acidificante foi feita utilizando um cilindro de CO₂ pressurizado (99,99%) para borbulhar o gás no meio de cultivo após a inserção dos reagentes em ambos os tratamentos. O borbulhamento foi realizado pontualmente em etapa anterior ao cultivo e com auxílio de um pHmetro até atingido o pH 6.0.

Os efeitos na concentração de carbono dissolvido e no crescimento da biomassa foram avaliados após a tomadas amostras diariamente para análise de clorofila in vivo, número de células e pH e no início e ao final do experimento para análise de alcalinidade e avaliação do carbono inorgânico disponível. Uma repetição do experimento sem correção do pH foi utilizada como controle.

4.5.2 Avaliação de diferentes concentrações de fontes sólidas de Ci no crescimento de *Chlorella* sp.

Para determinar a concentração ótima dos reagentes para o crescimento de *Chlorella* sp. nas condições aplicadas, foram avaliadas diferentes concentrações de NaHCO₃ e CaCO₃ (Tabela 3), definidas com base nos resultados anteriores.

Tabela 3. Concentrações das fontes sólidas de C_i utilizadas em miliMolar (mM) e gramas/litro (g/L). Fonte: Autor.

Fonte de C_i	Unidade	Concentrações						
$NaHCO_3$	g/L	0	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00
	mM	0	2,9	5,9	11,9	23,8	47,6	95,23
$CaCO_3$	g/L	0	0,29	0,59	1,19	2,38	4,76	9,52
	mM	0	2,9	5,9	11,9	23,8	47,6	95,23

O pH foi corrigido com inserção de CO_2 (99,9%) até o pH 6.0 e os tratamentos foram analisados quanto as concentrações de carbonatos e bicarbonatos através da análise de alcalinidade total a cada dois dias. O pH foi monitorado diariamente e foram tomadas amostras para análise em duplicata do número de células e clorofila *in vivo* até a atingida a fase platô de crescimento.

4.5.3 Avaliação de diferentes fontes de C_i no cultivo de microalgas

Para comparação de diferentes fontes de carbono inorgânico no crescimento de microalgas, a aeração foi utilizada como fonte de suplementação direta de CO_2 gasoso a 0,04% (concentração atmosférica), além de representar uma forma tradicional de suplementação em cultivos. A aeração foi aplicada diariamente durante toda a fase clara do cultivo (12hs/dia) através de sistema de aeração com filtro de linha a uma vazão de 4L/h. As concentrações ótimas de $NaHCO_3$ e $CaCO_3$ definidas nos ensaios anteriores foram utilizadas como fontes sólidas de C_i e ensaios sem fontes sólidas ou aeração foram utilizados como grupo controle.

O pH inicial de todos os tratamentos, incluindo o grupo controle, foi corrigido através do borbulhamento de CO_2 (99,9%) até o pH 6.0 para evitar que pHs iniciais diferentes interferissem nos resultados. Além do inóculo de *Chlorella* sp., foi avaliado também o crescimento de inóculo misto proveniente de uma lagoa de alta taxa (LAT) tratando efluente anaerobio, aplicando-se os mesmos tratamentos descritos, conforme tabela 4.

Tabela 4. Tratamentos utilizados para os testes com diferentes fontes de suplementação em efluente sanitário (EFN) e suas respectivas concentrações. Fonte: Autor.

Identificação	Tratamentos	
	Fonte de carbono adicionada	Concentração
EFN _c	Sem fontes adicionais	-
EFN +Na 0,20%	NaHCO ₃	2,00 g/L
EFN +Ca 0,12%	CaCO ₃	1,19 g/L
EFN +Ar	CO ₂ (atm)	0,04%

Após o preparo, os tratamentos foram analisados quanto as concentrações de carbonatos e bicarbonatos através da análise de alcalinidade total a cada dois dias. O pH foi monitorado e foram tomadas amostras diariamente para análise em duplicata do número de células e clorofila *in vivo*.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Análise do crescimento

A contagem do número de células foi utilizada como parâmetro direto de avaliação do crescimento, realizada em câmara de Neubauer (BASTIDAS, 2018) através de microscópio óptico ZEISS® com aumento de 40x. A contagem foi feita em duplicata e os resultados plotados em planilha Excel para obtenção da curva de crescimento, expressa em número de células/unidade de tempo. A partir da curva de crescimento, foi identificada a fase exponencial e calculadas as taxas de crescimento (μ):

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i}$$

onde X_i e X_f são a concentração de células no início (t_i) e final (t_f) da fase exponencial de crescimento.

O teor de clorofila *in vivo* foi utilizado como parâmetro indireto de crescimento a partir da análise de 3mL da amostra em fluorímetro portátil AquaFluor®. As análises foram realizadas em duplicata e as amostras foram diluídas para obtenção de leituras na faixa de 20-80 µg/L.

A análise de sólidos suspensos totais (SST) foi utilizada para expressar valores de biomassa (mg/L) através da filtragem de 50mL da amostra em membrana de fibra de vidro (GF-1 0,7µM) e secagem em estufa a 105°C de acordo com metodologia descrita em APHA (2005). O teor de clorofila *in vivo* foi utilizado como parâmetro indireto para cálculo da biomassa ao longo do cultivo, através da construção e análise de curvas de correlação entre os parâmetros, devido a limitação de volume das unidades experimentais. A partir das curvas de calibração as seguintes fórmulas e correlações foram obtidas:

Para *Chlorella* sp. (L06),

$$\text{Biomassa seca (mg L}^{-1}\text{)} = 0.4907 \times \text{clorofila (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} + 24.41, R^2 = 0.9832$$

Para inóculo misto,

$$\text{Biomassa seca (mg L}^{-1}\text{)} = 0.6576 \times \text{clorofila (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} + 22.062, R^2 = 0.9448$$

A produtividade volumétrica da biomassa (BP; mg/L d⁻¹) foi calculada através da equação:

$$BP = \frac{B_f - B_i}{t_f - t_i}$$

onde B_i e B_f são os valores expressos em biomassa no início e ao final da fase exponencial de crescimento.

4.6.2 Análise da disponibilidade e utilização de carbono inorgânico dissolvido

A quantificação do carbono inorgânico dissolvido (C_{id}) no meio disponível na forma de bicarbonatos e carbonatos foi realizada através da análise de Alcalinidade Total (mg/L $CaCO_3$), feita em duplicata utilizando 10mL de amostra filtrada em membrana de fibra de vidro (GF-1), e calculada através das proporções das formas químicas de acordo com a tabela 4 (APHA, 2005).

Tabela 3. Cálculo das concentrações de carbonatos e bicarbonatos. Onde F = Alcalinidade à fenolftaleína e T = Alcalinidade total. Fonte: APHA (2005).

RESULTADO DA TITULAÇÃO	ALCALINIDADE DE HIDRÓXIDOS (mg/L $CaCO_3$)	ALCALINIDADE DE CARBONATOS (mg/L $CaCO_3$)	ALCALINIDADE DE BICARBONATOS (mg/L $CaCO_3$)
F = 0	0	0	T
F < ½ T	0	2F	T-2F
F = 1/2T	0	2F	0
F > 1/2T	2F-T	2(T-F)	0
F=T	T	0	0

A concentração de carbono na forma de carbonatos ($C-CO_3$) pôde ser obtida através da conversão da alcalinidade de carbonatos em mg/L de $CaCO_3$ para mg/L de CO_3 e posteriormente a conversão para seu conteúdo em mg/L de C, através de cálculo estequiométrico:

$$\text{mg/L } CO_3 = \text{mg/L } CaCO_3 * 0,60$$

$$\text{mg/L } C-CO_3 = \text{mg/L } CO_3 * 0,20$$

Como equação geral, temos:

$$\text{mg/L } C-CO_3 = \text{mg/L } CaCO_3 * 0,12$$

A concentração de carbono na forma de bicarbonatos (C-HCO₃) pôde ser obtida utilizando a mesma lógica, tendo como base a estequiometria da fórmula:



Onde 1 mol de CaCO₃ equivale a 2 mols de HCO₃, temos então:

$$\text{mg/L HCO}_3 = \text{mg/L CaCO}_3 * 1,22$$

$$\text{mg/L C-HCO}_3 = \text{mg/L HCO}_3 * 0,19$$

Como equação geral, temos:

$$\text{mg/L C-HCO}_3 = \text{mg/L CaCO}_3 * 0,2318$$

Desprezando-se a concentração de carbono na forma de CO₂ dissolvido, as variações na concentração de carbono inorgânico dissolvido (ΔC) durante o cultivo foram calculadas através da diferença entre a soma das concentrações iniciais ($\sum C_0$) e finais ($\sum C_f$) de carbono na forma de carbonatos e bicarbonatos, de acordo com a fórmula:

$$\Delta C = \sum C_0 - \sum C_f \quad (5)$$

4.6.3 Análise de carbono orgânico total (COT)

Para a análise do COT da biomassa nos ensaios preliminares, amostras foram tomadas ao final do cultivo para análise de SST (conforme descrito em 4.5.1) e para análise da demanda química de oxigênio (DQO) da amostra bruta e filtrada (APHA, 2005). Os valores de DQO da amostra filtrada foram subtraídos dos valores brutos para estimar a DQO associada a biomassa. Os valores de DQO (mg de O₂/L) da biomassa foram então convertidos em COT (mg de C/L) aplicando-se a fórmula proposta por Dubber & Gray (2010) para monitoramento de efluentes sanitários:

$$DQO = 49.2 + 3.00 \cdot COT$$

Os valores de COT foram então confrontados com os valores de SST ao final do cultivo para cálculo da porcentagem de carbono orgânico da biomassa (%C_{org}):

$$\%C_{org} = COT/SST \cdot 100$$

4.6.4 Análise da razão SV/ST da biomassa

Ao final de cada experimento, o volume restante de cada tratamento foi centrifugado separadamente a 3.500 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante foram realizadas mais duas centrifugações adicionando-se água destilada para solubilização e remoção de precipitados minerais. A biomassa concentrada foi transferida para frascos de vidro e levada à estufa a 105°C até a estabilização do seu peso. Os frascos contendo a biomassa seca foram então selados e mantidos sob refrigeração a -6°C até o momento da análise.

Foram utilizados frascos de vidro (xx mL) previamente muflados e verificados quanto a sua integridade após calcinação. Foram utilizados cerca de 25 mg de cada amostra, submetidos as análises em duplicata de sólidos totais e sólidos voláteis conforme metodologia descrita em APHA (2005). A razão entre os valores de sólidos voláteis e sólidos totais foi então calculada e expressa em porcentagem de sólidos voláteis (% SV).

4.6.5 Análises estatísticas

Os ensaios preliminares e experimentos com diferentes concentrações das fontes sólidas de Ci foram realizados em duplicata e os experimentos testando diferentes fontes de Ci foram realizados em 2 repetições. Os resultados foram expressos em médias (com desvio padrão) das duplicatas e repetições. As

análises de correlação foram realizadas através de teste correlação linear utilizando o programa Excel®. Foi realizada análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para verificar diferenças significativas entre os tratamentos, através do programa BioEstat 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios preliminares

O inóculo de *Chlorella* sp. foi cultivado durante 7 dias até que fosse identificado o início da fase estacionária e coletadas as amostras para cálculo do teor de carbono orgânico total da biomassa. As análises de DQO da biomassa resultaram em uma média de 438,55 mg O₂/L (σ = 65,19) e as análises do teor de sólidos suspensos em 195 mg/L (σ = 1,41), indicando uma porcentagem média de 66,5% de carbono orgânico na biomassa.

A composição elementar da biomassa proposta por Redfield C106H181O45N16P sugere uma proporção de aproximadamente 52,5% carbono (C), 9,2% nitrogênio (N) e 1,3% fósforo (P) (ROGERS et al., 2014). A partir dos dados do teor de carbono da biomassa e no histórico das concentrações de carbono inorgânico, nitrogênio e fósforo do efluente utilizado, foi possível estipular a quantidade de carbono necessária para se atingir a concentração máxima de biomassa com a quantidade de nutrientes disponíveis. Neste caso, a concentração de carbono na forma de CO₂ dissolvido foi desprezada devido a sua baixa solubilidade em água e a predominância das formas carbonatadas e bicarbonatadas na faixa de pH utilizada.

Como resultado, foi calculado que cerca de 282 mg de carbono seriam necessários para se atingir um máximo de 425 mg de biomassa em 1 L de

efluente, utilizando como referência uma proporção de 66,5% de C, 9,2% de N e 1,3% de P. Para que a quantidade de carbono calculada seja disponibilizada, deve ser feita uma suplementação de cerca de 223 mg/L de C, uma vez que a alcalinidade do efluente utilizado equivale em média a 59 mg/L ($\sigma = 5,78$) de carbono inorgânico. Caso a porcentagem de carbono proposta por Redfield seja utilizada, seriam necessários 205 mg/L de carbono para atingir um máximo de 391 mg/L de biomassa, sendo necessária uma suplementação de 146 mg/L de carbono inorgânico.

A composição elementar da biomassa pode variar conforme as condições de cultivo a que for submetida, estudos realizados com a mesma cepa utilizada neste experimento, exposta a diferentes taxas de diluição, mostraram que a porcentagem de lipídios e carboidratos variou conforme a taxa de diluição aplicada, de 10% e 30% na maior taxa, até 19% e 45% na menor taxa de diluição, respectivamente (PEREIRA et al., 2018). Outros estudos mostraram que a adição de 0,9 g/L de bicarbonato de sódio no meio de crescimento aumentou o conteúdo de carboidrato de *Scenedesmus* sp. de 18.55% para 30.88% (PANCHÁ et al., 2015). Fan et al. (2012) sugere que a disponibilidade de carbono em excesso é o principal fator responsável pelo aumento da biosíntese de óleos em *Chlamydomonas reinhardtii*, onde o acúmulo de óleo sob escassez de nitrogênio foi estritamente dependente da concentração de carbono disponível no meio, aumentando conforme carbono em excesso, além do necessário para a biosíntese de amido e metabolismo do nitrogênio, foi adicionado. Para que os efeitos de diferentes concentrações dos reagentes selecionados fossem avaliados, as concentrações foram definidas conforme a tabela 4.

Tabela 4. Concentrações dos reagentes bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e carbonato de cálcio (CaCO_3) e sua concentração equivalente em carbono. Fonte: Autor.

Concentração do reagente (g/L)		Equivalente em C (mg/L)
NaHCO_3	CaCO_3	
0,25	0,29	35,7
0,50	0,59	71,4

1,00	1,19	142,8
2,00	2,38	285,6
4,00	4,76	571,2
8,00	9,52	1142,4

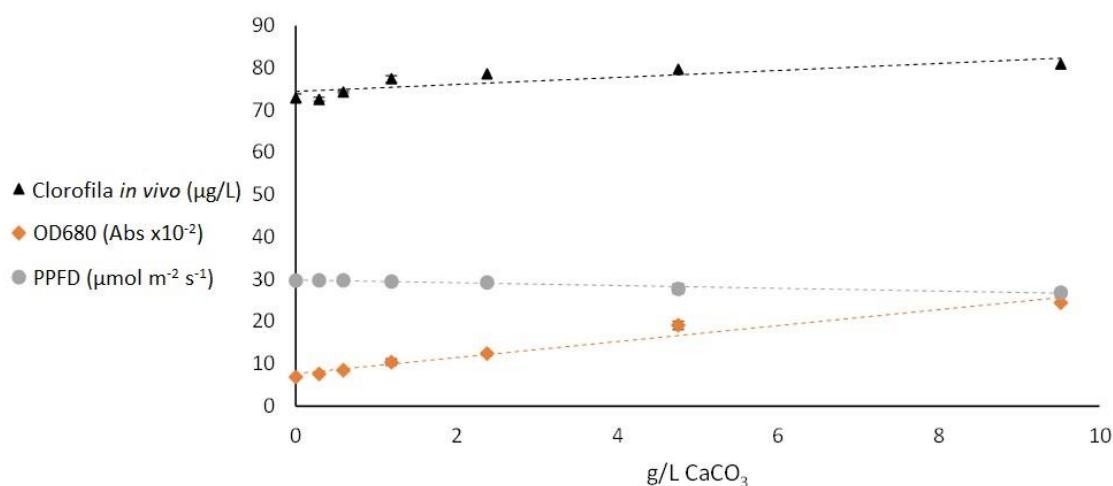
Os resultados de interferência do CaCO_3 na leitura de parâmetros demonstraram interferências positivas e negativas dependendo do parâmetro avaliado (fig. 6). Para as leituras de intensidade luminosa, o aumento na concentração do reagente provocou uma interferência negativa, reduzindo a leitura em até 9,5% para a maior concentração testada. Para avaliação dos parâmetros indiretos de crescimento, a concentração do inóculo utilizada foi o equivalente a 0,071 abs (OD680) e 73 $\mu\text{g/L}$ de clorofila *in vivo*. A densidade óptica foi o parâmetro com maior interferência devido a variação na concentração do reagente, aumentando de 10,8% a 254,3% o valor das leituras para a menor e maior concentração testada, respectivamente. A clorofila *in vivo* foi o parâmetro indireto de crescimento menos afetado com o aumento das concentrações, chegando a uma interferência positiva máxima de 10,9% com a adição de 9,52 g/L ao meio de cultivo.

A espectrofotometria por absorção utilizada para análise da densidade óptica baseia-se na quantidade de luz que é absorvida pela amostra. A luz em um dado comprimento de onda é emitida e captada por um detector na extremidade oposta após a passagem pela amostra, a diferença de intensidade da luz emitida e captada é então utilizada para o cálculo da absorbância. A presença de partículas em suspensão além de células de microalgas, como os carbonatos, pode contribuir na absorção ou dispersão da luz emitida, fazendo com que a luz não atinja o detector e seja associada à luz absorvida, provocando leituras superestimadas da biomassa.

A espectrofotometria por fluorescência utilizada na análise do teor de clorofila *in vivo* baseia-se na quantidade de luz emitida pela substância que se

deseja quantificar. A luz em um dado comprimento de onda é emitida para excitar os átomos ou moléculas da amostra, que então emitem luz com menor energia que é captada por um detector. Neste caso, o comprimento de onda da luz que chega ao detector é diferente da luz que é utilizada para excitar a amostra. O fluorímetro utilizado emite um comprimento de onda que excita as moléculas de clorofila A e capta a luz no comprimento de onda correspondente à sua fluorescência, o que significa que as moléculas de CaCO_3 não contribuiriam na emissão de fótons e pode explicar a menor interferência do aumento das concentrações do reagente na leitura deste parâmetro.

Figura 6. Leitura dos parâmetros de clorofila *in vivo*, densidade optica (OD680) e intensidade luminosa (PPFD) em meio efluente contendo a mesma concentração de inóculo e diferentes concentrações de CaCO_3 .

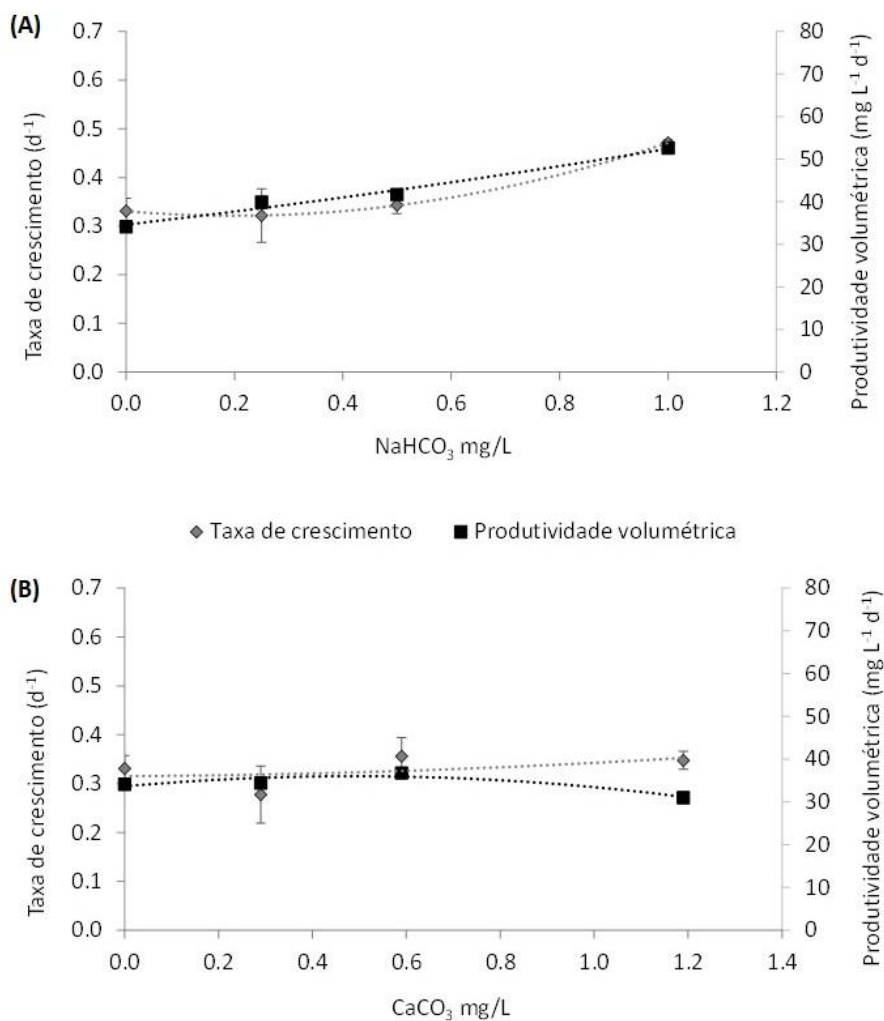


Como base nos resultados obtidos, a clorofila *in vivo* foi definida como o parâmetro indireto de crescimento a ser utilizado, devido a alta sensibilidade da densidade óptica às variações na concentração de carbonatos em suspensão.

5.2 Correção do pH inicial com CO₂ e seus efeitos

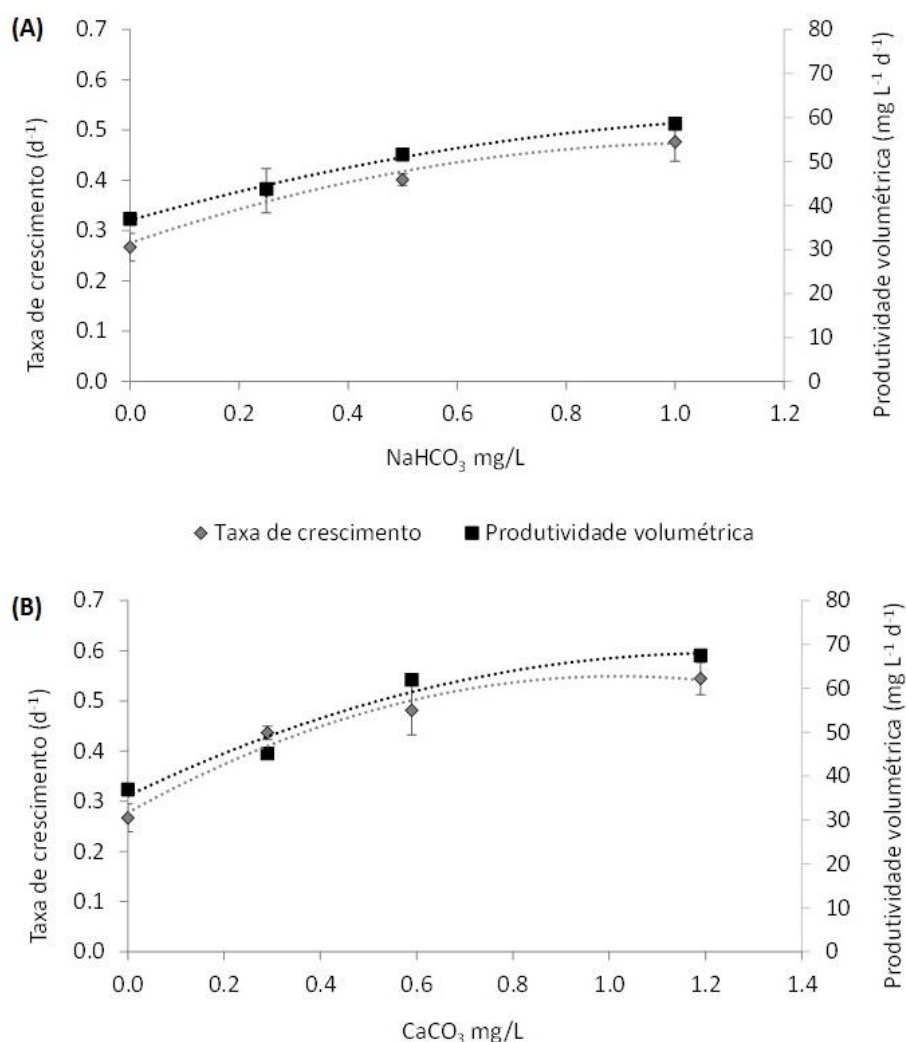
Devido ao aumento do pH promovido pelo uso de CaCO₃ e sua baixa solubilidade em água, a correção do pH através do uso de CO₂ como agente acidificante foi investigada. Para investigar os efeitos da correção do pH inicial nas concentrações de carbono dissolvido e no crescimento de *Chlorella* sp., ensaios com diferentes concentrações dos reagentes foram realizados. Os resultados mostram uma correlação positiva entre o aumento na concentração de NaHCO₃ e as taxas de crescimento e produtividade para ambos os tratamentos (Fig. 7-A e 8-A), chegando a uma produtividade máxima de 58,6 mg.L⁻¹.d⁻¹ ($\sigma = 0,4$) e taxa de crescimento de 0.48 d⁻¹ ($\sigma = 0,04$) com a adição de 1,0 mg/L de NaHCO₃ ao meio de cultivo, não havendo diferenças significativas associadas a correção do pH inicial.

Figura 7. Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella* sp. cultivada em diferentes concentrações de NaHCO_3 (A) e CaCO_3 (B).



Já os resultados de crescimento suplementado com CaCO_3 mostraram diferenças significativas para os tratamentos com e sem correção do pH inicial. Nos tratamentos sem a correção com CO_2 houve uma tendência de redução na produtividade de *Chlorella* sp. conforme o aumento na concentração do reagente (Fig. 7-B), enquanto a suplementação de CaCO_3 com correção do pH inicial mostrou correlações positivas indicando um aumento significativo na produtividade e taxas de crescimento até um máximo de $67,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($\sigma = 0,25$) e $0,54 \text{ d}^{-1}$ ($\sigma = 0,03$) respectivamente para $1,19 \text{ mg/L}$ de CaCO_3 (Fig. 8-B), valores superiores aos obtidos com o uso de NaHCO_3 .

Figura 8. Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella* sp. cultivada em diferentes concentrações de NaHCO_3 (A) e CaCO_3 (B) com correção do pH inicial.



As concentrações iniciais de carbono inorgânico dissolvido (Ci_d) no meio mostraram diferenças significativas entre os tratamentos com e sem correção do pH (Tabela 4). O aumento nas taxas de crescimento e produtividade associados a correção do pH nos experimentos contendo CaCO_3 pode estar associada a uma maior disponibilidade de carbono. O incremento na concentração de Ci dissolvido com a adição de 1,19 g CaCO_3 foi cerca de 2,21 vezes maior nos ensaios com correção do pH quando comparados aos ensaios sem a correção com CO_2 , aumentando em 201% a concentração inicial.

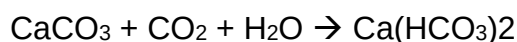
Tabela 4. Valores iniciais de pH e carbono inorgânico dissolvido (C_{id}) nos ensaios sem e com correção do pH inicial em cultivo de *Chlorella sp.* com diferentes concentrações de $CaCO_3$, os valores de ΔC representam o incremento na concentração de C_{id} para as diferentes concentrações avaliadas.

$CaCO_3$					
Parâmetro	unidade	0,0 g/L	0,29 g/L	0,59 g/L	1,19 g/L
pH	-	7,1	9,3	9,9	10,4
C_{id}	mg L ⁻¹	73.0 ± 1.6	84.6 ± 0.1	114.7 ± 11.8	162.5 ± 6.1
ΔC	mg L ⁻¹	-	11.6	41.7	89.5
$CaCO_3$ + correção pH					
Parâmetro	unidade	0,0 g/L	0,29 g/L	0,59 g/L	1,19 g/L
pH	-	7,0	7,2	7,3	7,2
C_{id}	mg L ⁻¹	65.7 ± 1.5	105.7 ± 5.0	167.2 ± 0.1	263.6 ± 1.6
ΔC	mg L ⁻¹	-	40.0	101.5	197.9

Pelo fato do $CaCO_3$ ser um reagente de baixa solubilidade em água (14 mg/L a 20°C), parte do reagente adicionado nos ensaios sem controle de pH não solubiliza e permanece precipitado no meio, principalmente com o aumento no pH, não sendo detectado nas análises de alcalinidade. Isto corrobora com o fato da quantidade de C_i dissolvido disponível após a adição do reagente ter sido menor do que a esperada para os ensaios sem controle de pH. Os resultados de C_i dos ensaios com 0,29, 0,59 e 1,19 g/L foram 22,1%, 20,6% e 24,7% menores do que esperado com a adição do reagente, respectivamente.

Além de possíveis variações na pureza do reagente utilizado, a presença de carbonatos precipitados explicaria a menor disponibilidade de carbono dissolvido quando comparados aos ensaios para as mesmas concentrações com pH corrigido. Porém, a quantidade de C_i dissolvido nos ensaios com correção de pH foram superiores ao esperado em caso de solubilidade total do reagente. A quantidade de C_{id} disponível no início do experimento com 0,29, 0,59 e 1,19 g/L de $CaCO_3$ foram 4,3%, 22% e 26,4% maiores do que o esperado com a adição do reagente, respectivamente. Os resultados indicam que houve fixação de carbono no meio alcalino, uma vez que o borbulhamento de CO_2 na presença de

CaCO₃ leva a fixação do CO₂ na sua forma bicarbonatada (HCO₃) através da reação:



A quantidade de Ci dissolvido no início dos ensaios com NaHCO₃ sem correção do pH foi 16,6%, 13,9% e 17,5% menor do que o esperado para os tratamentos com 0,25, 0,5 e 1 g/L do reagente, respectivamente, indicando que também podem ter ocorrido precipitações com o aumento do pH do meio de cultivo. Os valores de Ci para os ensaios com correção do pH foram 7,2%, 2,1% e 2,9% menores do que esperado para as mesmas concentrações descritas anteriormente, respectivamente (Tabela 5). O aumento na concentração de Ci dissolvido associado a correção do pH nos tratamentos com NaHCO₃ foi significativamente menor, o que é esperado devido à adição do reagente provocar uma menor alteração do pH inicial e à maior parte do carbono já se encontrar na forma de bicarbonatos (Fig. 9-A).

Tabela 5. Valores iniciais de pH e carbono inorgânico dissolvido (Ci_d) nos ensaios sem e com correção do pH inicial em cultivo de *Chlorella* sp. com diferentes concentrações de NaHCO₃, os valores de ΔC representam o incremento na concentração de Ci_d para as diferentes concentrações avaliadas.

NaHCO ₃					
Parâmetro	unidade	0,0 g/L	0,25 g/L	0,50 g/L	1,00 g/L
pH	-	7,1	8,3	8,3	8,4
Ci _d	mg L ⁻¹	73.0 ± 1.6	90.6 ± 3.2	124.3 ± 4.9	177.9 ± 8.2
ΔC	mg L ⁻¹	-	17.6	51.3	104.9
NaHCO ₃ + correção pH					
Parâmetro	unidade	0,0 g/L	0,25 g/L	0,50 g/L	1,00 g/L
pH	-	7,0	6,9	7,2	7,0
Ci _d	mg L ⁻¹	65.7 ± 1.5	94.0 ± 1.8	134.2 ± 3.6	202.4 ± 1.8
ΔC	mg L ⁻¹	-	28.3	68.5	136.6

Em estudo realizado por Zawar et al. (2016) com borbulhamento de CO₂ em meios alcalinos para cultivo de *Chlorella sorokiniana* e *Arthrospira* sp., o

incremento na concentração de bicarbonatos mostrou ser dependente da concentração de hidróxido de cálcio utilizada inicialmente, onde a maior formação de bicarbonato, na faixa de 850-960 mg/L, foi obtida com a utilização de 3,57 mM de óxido de cálcio (CaO) e o crescimento de ambas as culturas foi maior conforme o aumento das concentrações iniciais de bicarbonatos. Em outro estudo com cultivo de *Chlorella* sp. em meio BG11, a utilização de 0,5 g/L de NaHCO₃ juntamente com CO₂ 1% (v/v) proporcionou maiores taxas de crescimento (0,61 d⁻¹) do que quando as fontes de carbono foram fornecidas individualmente (NAYAK *et al.*, 2018).

Para o crescimento ideal da maioria das espécies de microalgas, o pH adequado está na faixa do neutro ao levemente alcalino, alterações fora desta faixa resultam na redução da produtividade bem como na fixação de carbono (NAYAK *et al.*, 2018). Desta forma, pHs excessivamente altos sujeitam as células a limitação de carbono, uma vez que a maior parte do carbono inorgânico estará inacessível na forma de carbonatos. Porém, condições alcalinas são boas para limitar a perda de CO₂ para a atmosfera, em estudo com microalgas alcalifílicas uma maior proporção de CO₂ foi capturado, removendo de 50 a 65% de CO₂ do ar injetado no cultivo, quando comparados a uma remoção de apenas 38% por espécies acidofílicas (PIIPARINEN *et al.*, 2018).

A correção do pH inicial do meio apresenta, então, outra vantagem que é a conversão do carbono inorgânico disponível na forma de carbonatos para a forma de bicarbonatos, uma vez que o equilíbrio das formas de carbono neste pH desloca a reação para a formação da forma iônica HCO₃⁻:

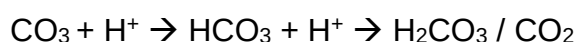
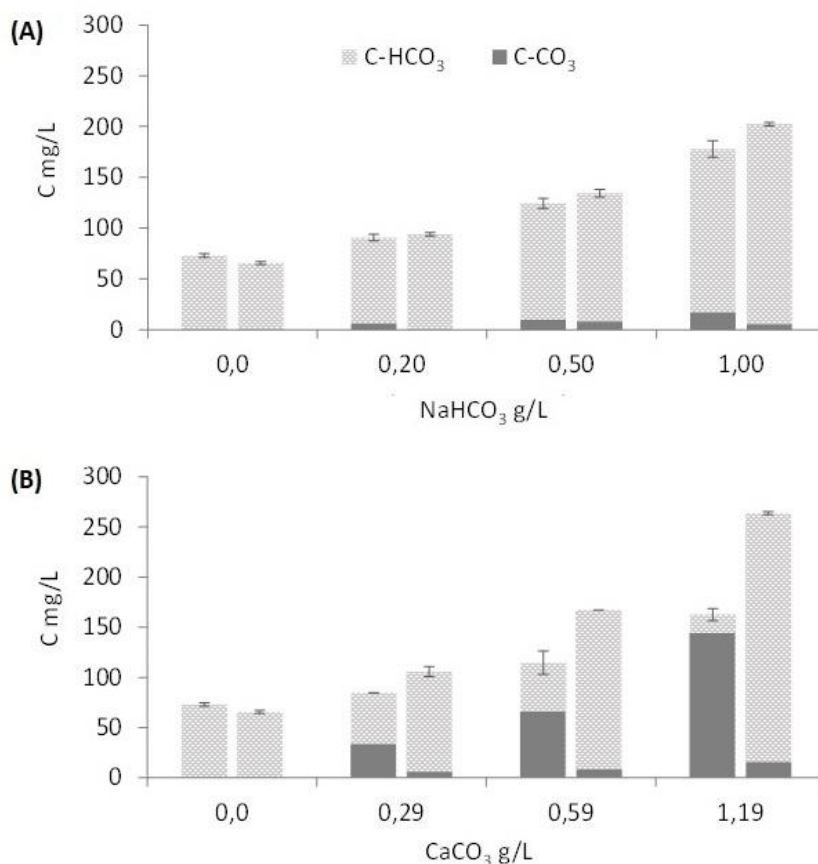


Figura 9. Concentrações iniciais de C dissolvido na forma de carbonatos (C-CO₃) e bicarbonatos (C-HCO₃) nos ensaios sem (colunas da esquerda) e com (colunas da direita) correção do pH

inicial do meio efluente suplementado com diferentes concentrações de CaCO_3 (A) e NaHCO_3 (B). Fonte: Autor.

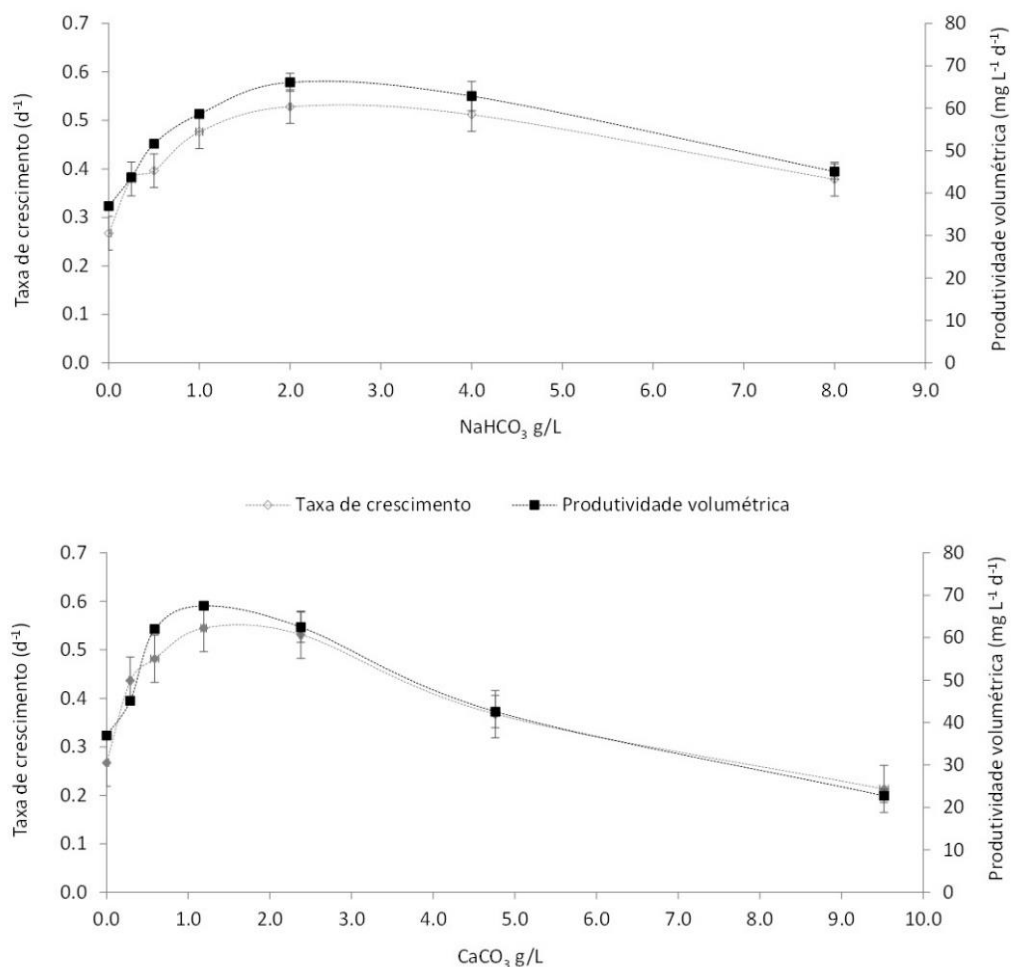


Os íons CO_3 não são biodisponíveis para as células de microalgas, uma vez que a enzima anidrase carbônica apenas realiza a conversão de íons HCO_3 em CO_2 , sendo assim a conversão físico-química do CO_3 em HCO_3 através do borbulhamento de CO_2 é vantajosa por permitir que o aporte de carbono se torne biodisponível para uso imediato pela biomassa de microalgas e possa ser biologicamente convertido em CO_2 . Assim, o fornecimento de CO_2 gasoso em momentos de alto pH no cultivo, como após a adição do CaCO_3 , seria uma forma de evitar perdas do CO_2 para a atmosfera, ao mesmo tempo em que se evita a limitação de carbono no meio devido a presença de carbonatos.

5.3 Resposta do crescimento de *Chlorella* sp. a diferentes concentrações de fontes sólidas de Ci

Depois de definida a etapa de correção do pH, foi investigada a concentração ótima dos reagentes para o cultivo de *Chlorella* sp. em efluente anaeróbio sob as condições aplicadas. Os resultados indicaram uma correlação positiva das taxas de crescimento e produtividade com concentrações de até 2,0 g/L de NaHCO_3 e 1,19 g/L de CaCO_3 , a partir das quais as taxas passaram a diminuir conforme o aumento na concentração dos reagentes (Fig. 10). Uma taxa de crescimento máxima de $0,53 \text{ d}^{-1}$ ($\sigma = 0,01$) e $0,54 \text{ d}^{-1}$ ($\sigma = 0,03$) foi obtida com o uso de 2g/L de NaHCO_3 e 1,19 g/L de CaCO_3 respectivamente, enquanto a produtividade máxima atingida foi de $66,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($\sigma = 2,1$) e $67,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($\sigma = 0,3$) para as mesmas concentrações.

Figura 10. Taxa de crescimento e produtividade volumétrica de *Chlorella sp.* cultivada em meio efluente com diferentes concentrações de NaHCO_3 e CaCO_3 . Fonte: Autor.



No geral, quando microalgas são expostas a altas concentrações de sódio, estes íons são acumulados até um grau excessivo, levando a inativação de algumas enzimas e posteriormente a inibição do crescimento (KIM et al., 2017). Como consequência, a maior parte das espécies de microalgas, inclusive espécies marinhas, possuem um pico de taxa de crescimento até certa concentração de NaHCO_3 , a partir da qual o crescimento é inibido com o aumento da concentração do reagente (WHITE et al., 2013).

A *Chlorella sp.* utilizada neste experimento demonstrou seu pico de crescimento com o uso de 2.0 g/L de NaHCO_3 , uma concentração relativamente alta quando comparado a outros estudos como o realizado por Pancha *et al.*

(2015), que obteve um aumento máximo de 23% na produção de biomassa de *Scenedesmus* sp. utilizando 0.6 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), ou por Mokashi *et al.* (2016), obtendo a maior taxa de crescimento específico ($0.653 \mu \text{d}^{-1}$) com o uso de 1.0 g/L de bicarbonato para *Chlorella vulgaris* isolada de uma estação de tratamento de esgotos. Os dados sugerem certa tolerância da cepa utilizada a aumentos na concentração de sódio, uma vez que o inóculo utilizado não foi aclimatado às concentrações testadas. É possível que devido às variações na composição do efluente em ETEs, cepas autóctones destes ambientes acabem naturalmente se adaptando à estas oscilações, porém existem cepas salino-alcálico tolerantes deste gênero capazes de tolerar até 80 g/L de NaHCO_3 (TU *et al.*, 2018).

Altas concentrações de cálcio também podem ser tóxicas para células de microalgas, causando efeitos inibitórios relacionados ao aumento do gasto energético, uma vez que energia extra é necessária para manter o mecanismo de efluxo de íons Ca^{2+} para fora da célula (CARNEIRO *et al.*, 2011). Zawar *et al.* (2016) testou diferentes concentrações de cálcio (CaCl_2) no crescimento de *Chlorella sorokiniana* e *Arthrospira* sp. e ambas apresentaram redução no crescimento conforme o aumento na concentração, embora a cepa de *Chlorella sorokiniana* tenha tolerado concentrações de até 0,3 M (12,0 g/L) de Ca. Quando comparadas as maiores concentrações de NaHCO_3 e CaCO_3 testadas, os valores de taxa de crescimento e produtividade foram significativamente menores com o uso do CaCO_3 , o que pode indicar uma maior sensibilidade da cepa utilizada ao aumento na concentração de cálcio. Porém, os menores valores encontrados podem estar associados também a uma menor disponibilidade de carbono dissolvido, uma vez que a solubilidade do CaCO_3 é menor e tende a reduzir conforme o aumento do pH ao longo do cultivo.

Os resultados de ΔC mostraram reduções significativas na concentração de Ci dissolvido no meio entre o início e fim do cultivo (Tabelas 6 e 7), esta diferença foi maior conforme o aumento na concentração dos reagentes,

inclusive para as maiores concentrações testadas, apesar de não estarem acompanhadas de incremento na biomassa. Os resultados indicam que as reduções na concentração de C_i podem estar associadas não somente ao consumo deste carbono pela biomassa, mas em grande parte pela precipitação de carbonatos conforme há o aumento do pH do cultivo devido a atividade fotossintética e crescimento celular. Em pHs alcalinos, antiportadores Ca^{2+}/H^+ transportam Ca^{2+} para fora da célula e esta exportação aumenta a concentração deste íon no meio extracelular, o que leva a calcificação ou precipitação de $CaCO_3$ (ZAWAR et al., 2016).

Tabela 6. Variação na concentração de carbono inorgânico dissolvido (ΔC) e concentração da biomassa ($B_{m\acute{a}x}$) ao final do cultivo de *Chlorella sp.* sob diferentes concentrações de $NaHCO_3$.

Fonte: Autor.

Parâmetro	unidade	NaHCO ₃ (g/L)						
		0,0	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	8,00
C_{i_d} (inicial)	mg L ⁻¹	65.7	93.9	134.2	202.3	268.1	516.6	941.2
		± 1.5	± 1.8	± 3.6	± 1.8	± 7.7	± 14.2	± 15.2
C_{i_d} (final)	mg L ⁻¹	15.0	24.6	38.4	71.4	70.8	223.0	548.8
		± 0.8	± 0.8	± 6.8	± 0.8	± 22.1	± 16.6	± 52.5
ΔC	mg L ⁻¹	50.7	69.4	95.8	130.9	197.3	293.7	392.4
$B_{m\acute{a}x}$	mg L ⁻¹	204.7	251.9	307.8	355.2	408.9	386.6	262.6
		± 6.7	± 6.3	± 4.3	± 4.1	± 14.9	± 23.9	± 12.6

Tabela 7. Variação na concentração de carbono inorgânico dissolvido (ΔC) e concentração da biomassa ($B_{m\acute{a}x}$) ao final do cultivo de *Chlorella sp.* sob diferentes concentrações de $CaCO_3$.

Fonte: Autor.

Parâmetro	unidade	CaCO ₃ (g/L)						
		0,0	0,29	0,59	1,19	2,38	4,76	9,52
C_{i_d} (inicial)	mg L ⁻¹	65.7	105.67	167.18	263.63	438.5	856.6	1643.6
		± 1.5	± 5.0	± 0.1	± 1.6	± 5.8	± 28.6	± 39.3
C_{i_d} (final)	mg L ⁻¹	15.0	30.00	58.80	135.35	203.8	454.4	1003.0
		± 0.8	± 1.7	± 11.9	± 1.8	± 13.3	± 5.3	± 76.7
ΔC	mg L ⁻¹	50.7	75.67	108.38	128.27	234.7	402.2	640.6
$B_{m\acute{a}x}$	mg L ⁻¹	204.7	260.9	379.3	415.8	383.8	245.4	107.4
		± 6.7	± 0.5	± 3.0	± 2.2	± 25.1	± 27.4	± 11.0

Os resultados de caracterização da biomassa também confirmam esta hipótese uma vez que não houve aumento na % de sólidos voláteis (% SV) para as maiores concentrações testadas, indicando que tanto o crescimento foi menor quanto a biomassa não aumentou sua proporção em carbono orgânico, o que poderia justificar alguma redução no carbono dissolvido no meio (Fig. 11 e 12).

Os resultados de teor de sólidos voláteis mostram um aumento na % SV conforme o aumento da concentração de NaHCO_3 até 2,0 g/L, chegando a um máximo de 86,1% ($\sigma = 0,8\%$). Em concentrações maiores, esta porcentagem reduziu juntamente com as taxas de crescimento e produtividade. Os ensaios com CaCO_3 seguiram o mesmo perfil chegando a um máximo de 85,8% ($\sigma = 1,2\%$) de sólidos voláteis para a concentração de 1,19 g/L.

Figura 11. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do experimento em mg/L para os ensaios com diferentes concentrações de NaHCO_3 . Fonte: Autor.

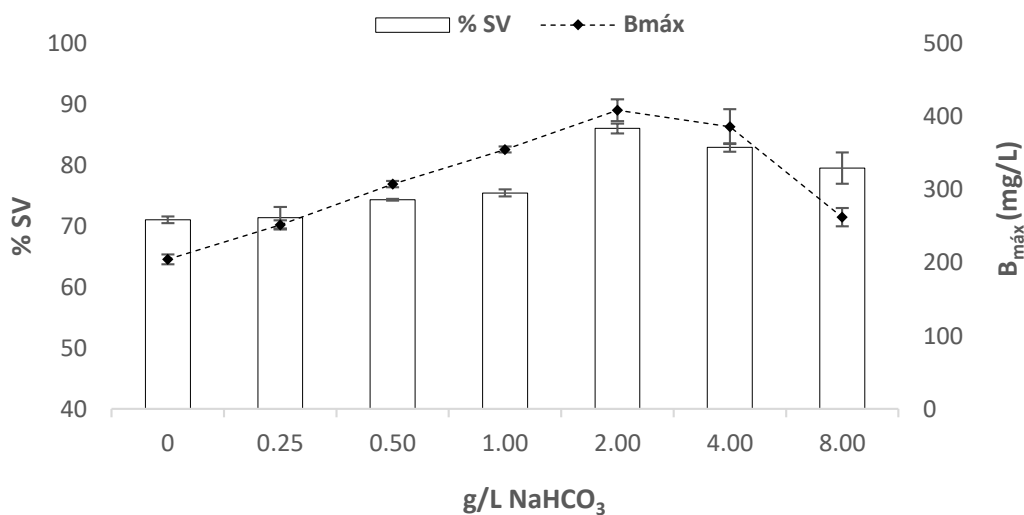
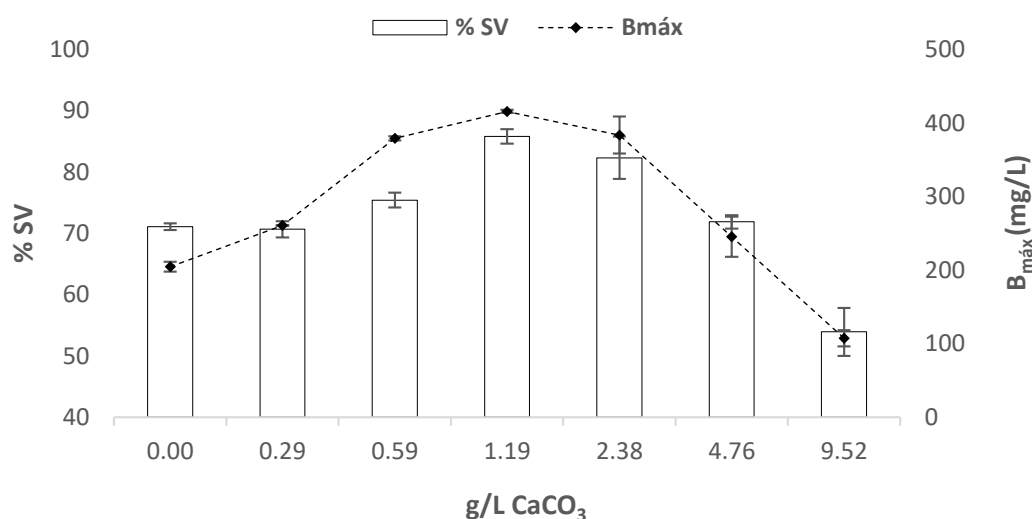


Figura 12. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do experimento em mg/L para os ensaios com diferentes concentrações de CaCO_3 . Fonte: Autor.



O teor de sólidos voláteis é um parâmetro indicativo do potencial de produção de biogás em biodigestores, uma vez que reflete a porcentagem da biomassa que pode ser digerida pela comunidade anaeróbia. O aumento na % SV com o aumento da concentração dos reagentes pode estar relacionado a um acúmulo de carbono no interior da célula, como reflexo de uma maior disponibilidade de carbono dissolvido no meio combinado à escassez de nutrientes ao final da fase exponencial do cultivo, consumidos nos processos de crescimento e divisão celular.

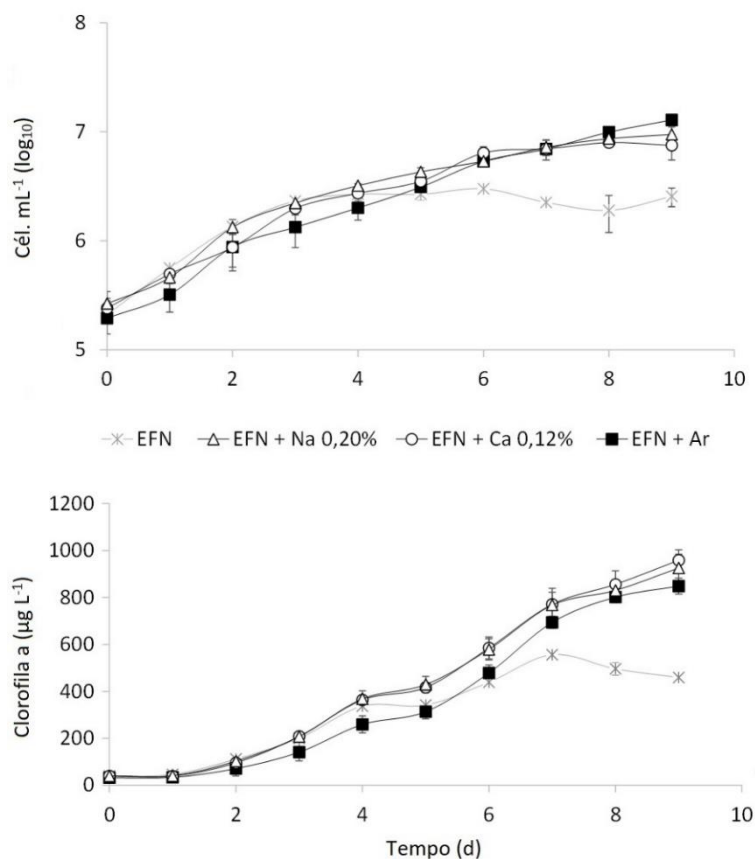
Por sua vez, a redução na % SV para as maiores concentrações testadas pode estar relacionado a um acúmulo de cálcio e sódio no interior da célula, devido ao seu excesso no meio extracelular, uma vez que o teor de cinzas na biomassa é composto principalmente por sais ligados a estrutura de carbono (PEREIRA et al., 2018). O bicarbonato possui um importante papel no acúmulo de lipídios em microalgas, uma vez que é o principal substrato na rota metabólica para biosíntese de ácidos graxos (NAYAK et al., 2018), sendo assim, a suplementação com bicarbonatos é potencialmente vantajosa para cultivo de biomassa visando a produção de biocombustíveis.

5.4 Avaliação de diferentes fontes de suplementação de Ci no cultivo de microalgas

Após o screening e definição das concentrações ótimas das fontes sólidas de carbono inorgânico, o uso dos reagentes foi comparado a ensaio utilizando a aeração (CO_2 0,4%) como forma convencional de aporte de CO_2 em cultivos de microalgas. Os resultados mostram que ambos os tratamentos proporcionaram um aumento no crescimento de *Chlorella* sp. (Fig. 13) quando comparados ao controle sem fontes adicionais de carbono. Com base nas curvas de crescimento, é possível notar uma redução na taxa de crescimento a partir do 4º dia de cultivo no ensaio controle, enquanto os ensaios com suplementação de carbono mantêm um crescimento constante até o 8º dia de cultivo.

Figura 13. Crescimento de *Chlorella* Sp. baseado no número de células e teor de clorofila in vivo ao longo do cultivo sob diferentes fontes de carbono inorgânico. EFN = Efluente Anaerobio

(controle); EFN + Na 0,20% = Adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = Adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = Aeração 12hs/dia. Fonte: Autor.



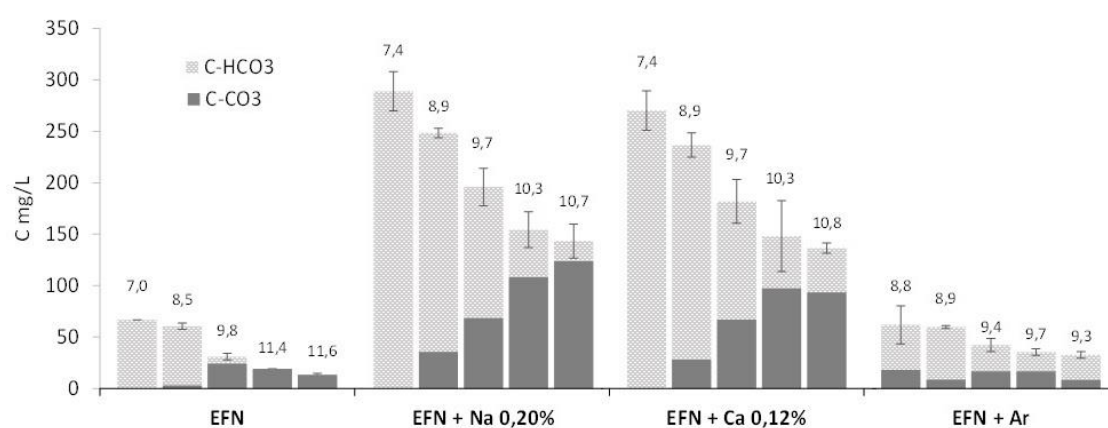
A redução do crescimento nos ensaios do grupo controle está provavelmente ligada ao esgotamento do carbono inorgânico disponível, de forma que a partir do 4º dia a quantidade de carbono disponível não mais suporta a manutenção das taxas de crescimento (divisão celular), o que não significa que as células não possam aumentar seu conteúdo intracelular a partir da absorção de outros nutrientes do meio. Os dados de carbono inorgânico dissolvido ao longo do cultivo corroboram com essa hipótese (Fig. 14), mostrando que no 4º dia de cultivo quase todo o carbono inorgânico nos ensaios do grupo controle se encontrava na forma de carbonatos, forma está de difícil assimilação pela biomassa de microalgas.

Para todos os ensaios, os resultados mostram uma redução na concentração total de Ci ao longo do cultivo, ao mesmo tempo em que as

concentrações de bicarbonatos diminuem e de carbonatos aumentam conforme há o aumento do pH, exceto pra o ensaio com aeração. Devido ao aporte constante de CO₂ atmosférico, o tratamento com aeração foi capaz de manter os valores de pH abaixo de 10 durante todo o período de cultivo, uma vez que o CO₂ é fonte de íons H⁺ quando dissolvido em água, sendo assim, grande parte do carbono disponível permaneceu na forma de bicarbonatos ao longo do cultivo.

A utilização de CO₂ gasoso é vantajosa por permitir um maior controle do pH ao longo do cultivo, permitindo a manutenção do pH em faixas onde a maior parte do carbono estará disponível na forma assimilável pela biomassa. Além disso, a aeração permite que haja o efeito de mistura no meio juntamente com o aporte de carbono, devido a movimentação causada pelo borbulhamento, reduzindo o sombreamento e a necessidade de outros mecanismos de mistura. No entanto, a inserção de CO₂ gasoso deve ser constante devido a baixa solubilidade deste gás, fazendo com que grande parte seja perdido para a atmosfera e o gasto energético para manutenção das condições ótimas de crescimento seja alto.

Figura 14. Concentração de carbono na forma de carbonatos (C-CO₃) e bicarbonatos (C-HCO₃) nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 do cultivo de *Chlorella* Sp. sob diferentes fontes de carbono inorgânico. Os valores acima das colunas representam o pH no momento da amostragem. Fonte: Autor.



Os ensaios com fontes sólidas de carbono inorgânico apresentaram resultados semelhantes de crescimento e variação na concentração das formas de Ci ao longo do tempo, reduzindo em 145,63 mg ($\sigma = 2,61$) e 133,67 mg ($\sigma = 14,25$) a concentração de carbono ao final do cultivo nos tratamentos utilizando NaHCO_3 e CaCO_3 , respectivamente. A redução na concentração de bicarbonatos coincide com a redução na taxa de crescimento após o 8º dia de cultivo, indicando que a baixa disponibilidade de Ci dissolvido também pode ter ocasionado a queda no crescimento de *Chlorella* sp. nas condições aplicadas. Apesar do pH ter aumentado de forma gradativa ao longo do cultivo para os ensaios com fontes sólidas, é possível observar uma menor variação quando comparado ao grupo controle, apesar dos tratamentos com suplementação terem apresentado maior crescimento fotossintético. A menor variação do pH pode ser relacionada ao efeito tamponante que os reagentes exercem sobre o meio. Conforme o H^+ é consumido durante a atividade fotossintética, a conversão do bicarbonato em carbonato repõe este próton através da reação:

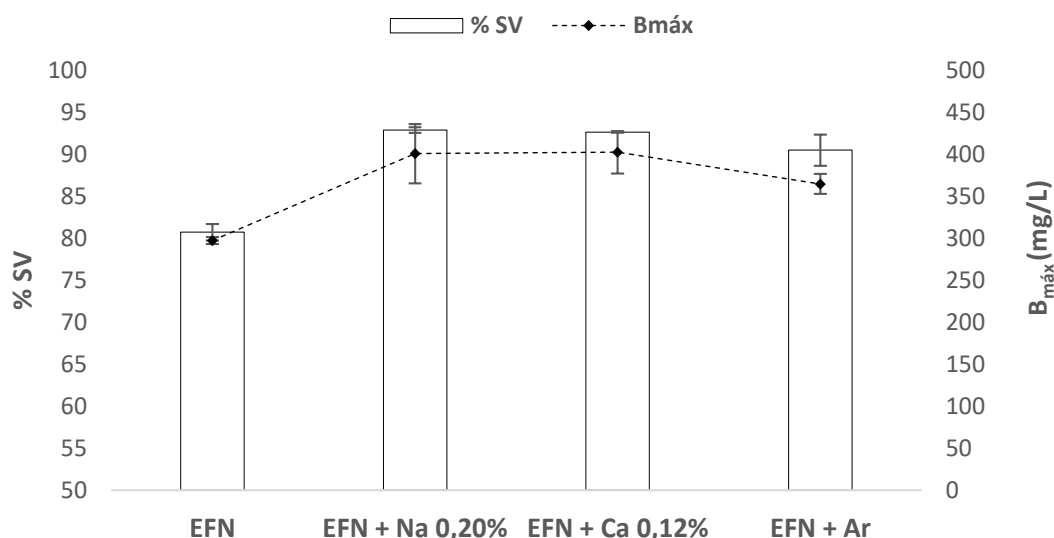


A biomassa de microalgas utiliza prótons H^+ no mecanismo de concentração de carbono, para realizar a conversão do bicarbonato acumulado no interior da célula em CO_2 dentro do cloroplasto para ação da Rubisco (Badger, 2003), fazendo com que a presença de bicarbonatos como agentes tampão seja vantajosa para o crescimento e acúmulo de carbono pela biomassa.

Como esperado, os resultados de % SV foram maiores para os tratamentos com suplementação de Ci quando comparados ao controle (Fig. 15), como reflexo da maior disponibilidade de carbono e possível esgotamento de nutrientes ao final do cultivo, levando a um acúmulo de carbono no interior da célula. Os valores de % SV e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) não diferiram significativamente entre os tratamentos com suplementação de carbono, chegando até 92,6% ($\sigma = 0,3$) no cultivo com 2,0 g/L de NaHCO_3 e a

uma concentração máxima de 402,5 mg/L ($\sigma = 25,2$) para o tratamento utilizando 1,19 g/L de CaCO_3 .

Figura 15. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do cultivo de *Chlorella* Sp. (L06) com diferentes fontes de carbono inorgânico em efluente anaeróbio. EFN = Efluente Anaerobio (controle); EFN + Na 0,20% = Adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = Adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = Aeração 12hs/dia. Fonte: Autor.

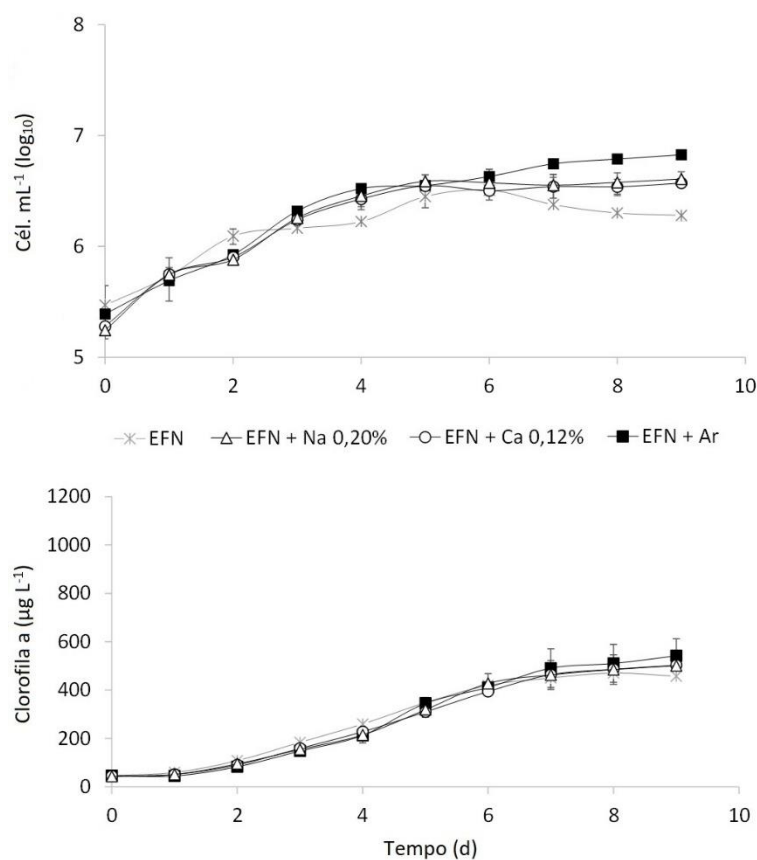


Em estudo realizado por Mokashi *et al.* (2016) com *Chlorella vulgaris*, a concentração da biomassa (1,54 g/L) e concentração de lipídios (16 mg/mL) foi significativamente maior em culturas suplementadas com 1 g/L de bicarbonato de sódio quando comparados ao controle, com o maior conteúdo de carbono (0,497 g/peso seco) e maior taxa de fixação de CO_2 ($0,69 \text{ g.mL}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) obtidos. Pancha *et al.* (2015) também demonstram que a suplementação de bicarbonatos promoveu, além de um aumento na concentração de biomassa, lipídios e carboidratos para *Scenedesmus* sp., uma redução no stress causado pela escassez de nitrogênio e fósforo, melhorando a produtividade da biomassa.

Os tratamentos utilizados para *Chlorella* sp. foram também aplicados em ensaios com um inóculo misto, proveniente de lagoa de alta taxa tratando efluente sanitário. Os resultados diferem na resposta do crescimento aos

tratamentos com suplementação de carbono (Fig. 16), visto que a biomassa difere da utilizada anteriormente. O inóculo misto mostrou uma baixa resposta, tanto ao aporte através da aeração, quanto ao aporte através das fontes sólidas nas condições e concentrações aplicadas. Ao final do período de cultivo (7º dia), foi possível observar uma queda na concentração celular para o grupo controle, indicando o início da fase de declínio celular, enquanto as concentrações dos tratamentos com fontes sólidas se mantiveram estáveis (fase estacionária) e o cultivo com aeração mostrou um pequeno aumento na sua concentração. Esta resposta pode estar relacionada a uma aclimação tardia do inóculo às novas condições de cultivo, uma vez que é esperado um efeito benéfico através da aeração no crescimento da maioria das espécies de microalgas.

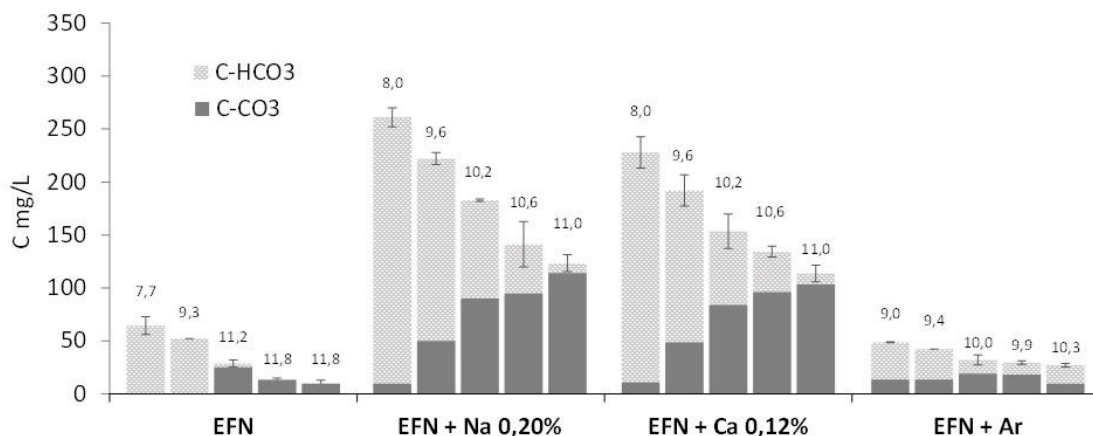
Figura 16. Crescimento de inóculo misto baseado no número de células e teor de clorofila in vivo ao longo do cultivo sob diferentes fontes de carbono inorgânico, onde: EFN = efluente anaeróbico (controle); EFN + Na 0,20% = adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = aeração 12hs/dia. Fonte: Autor.



É provável que a presença de diversas espécies em um consórcio de microalgas leve a uma resposta tardia no crescimento à mudanças ambientais, uma vez que, em um primeiro momento, ocorrerá a morte de cepas menos adaptadas e um aumento na concentração de espécies mais adaptadas as condições expostas. A resposta às condições apenas irá refletir em aumento na taxa de crescimento no momento em que as espécies adaptadas se tornam dominantes no meio. Cho *et al.* (2017) demonstrou que a diversidade de microalgas promoveu uma estabilidade na produtividade de biomassa em lagoas de alta taxa tratando esgoto sanitário. É importante ressaltar as vantagens que um consórcio de microalgas possui sobre culturas monoalgáceas, uma vez que em ambientes externos uma cultura mista possui maior resiliência a mudanças nas condições ambientais e a contaminações externas (PEREIRA *et al.*, 2018). Além disso, o screening com diferentes concentrações de fontes sólidas e com cultivos sequenciais poderia proporcionar uma resposta mais aproximada do crescimento do consórcio de microalgas à suplementação com fontes sólidas de carbono inorgânico.

Os resultados da concentração de Ci dissolvido ao longo do tempo mostram um perfil similar ao encontrado nos ensaios com *Chlorella* sp., com uma redução do Ci dissolvido ao mesmo tempo em que a proporção de carbonatos aumenta com o aumento do pH (fig. 17). Da mesma forma, o tratamento com aeração mostra uma resistência ao aumento na proporção de carbonatos ao longo do tempo, uma vez que o constante aporte de H^+ promove a reconstituição do íon bicarbonato.

Figura 17. Concentração de carbono dissolvido na forma de carbonatos e bicarbonatos nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 do cultivo de inóculo misto sob diferentes fontes de carbono inorgânico. Os valores acima das colunas representam o pH no momento da amostragem. Fonte: Autor.



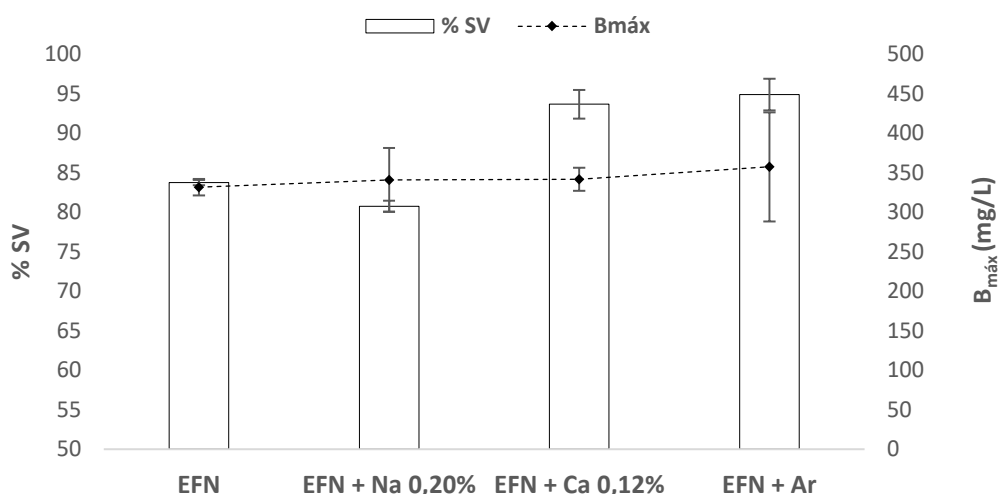
Ao final do cultivo, os ensaios com fontes sólidas mostraram uma redução de 137,83 mg ($\sigma = 16,92$) e 114,13 mg ($\sigma = 22,71$) na concentração de carbono dissolvido para os tratamentos com NaHCO_3 e CaCO_3 , respectivamente. Estes valores foram similares aos ensaios com *Chlorella* sp. e significativamente maiores do que o grupo controle (54,74 mg; $\sigma = 4,99$), embora não fosse acompanhada de uma maior concentração de biomassa, sugerindo que grande parte do carbono adicionado sofreu precipitação com o aumento do pH.

Embora a precipitação de carbonatos inviabilize sua utilização pela biomassa, diferentemente do CO_2 gasoso, o mesmo não é perdido para a atmosfera e pode ser ressuspendido através do aporte de íon H^+ no meio de cultivo. Em estudo realizado por Konst *et al.* (2017), *Chlorella* sp. foi cultivada em meio líquido contendo carbonatos para absorção de CO_2 por 150 dias consecutivos, a biomassa pôde ser recuperada e o meio reciclado com nova fixação de CO_2 e cultivo de biomassa por 7 vezes seguidas sem declínio na sua produtividade.

Os resultados de % SV da biomassa do consórcio de microalgas foram maiores para os tratamentos com CaCO_3 e aeração, com uma proporção de

92,4% ($\sigma = 1,8$) e 93,5% ($\sigma = 2,0$) de sólidos voláteis na biomassa recuperada, respectivamente, embora a concentração máxima de biomassa alcançada não tenha diferido de forma significativa entre os tratamentos (Fig. 18).

Figura 18. Teor de sólidos voláteis (% SV) e concentração máxima de biomassa ($B_{\text{máx}}$) ao final do cultivo de inóculo misto, proveniente de lagoa de alta taxa, com diferentes fontes de carbono inorgânico em efluente anaeróbio. EFN = efluente anaeróbio (controle); EFN + Na 0,20% = adição de 2,0 g/L de NaHCO_3 ; EFN + Ca 0,12% = adição de 1,19 g/L de CaCO_3 ; EFN + Ar = aeração 12hs/dia. Fonte: Autor.



Os resultados indicam que, apesar de não terem proporcionado um aumento no crescimento, o aumento na disponibilidade de carbono devido a suplementação com carbonato de cálcio e aeração promoveu um acúmulo de carbono na biomassa, aumentando sua porcentagem em sólidos voláteis. Entretanto, a suplementação com NaHCO_3 mostrou um efeito negativo, reduzindo a %SV da biomassa quando comparada ao controle. A redução no teor de sólidos voláteis na biomassa cultivada com bicarbonato de sódio pode estar relacionado a um acúmulo de sais pela biomassa, indicando uma baixa eficiência na exportação de Na^+ para fora da célula.

6 CONCLUSÕES

Os resultados mostraram uma concentração ótima de 2,0 g/L de NaHCO_3 e 1,19 g/L de CaCO_3 para crescimento de *Chlorella* sp. cultivada em efluente anaeróbio. Os resultados de taxa de crescimento e produtividade foram 2,0 vezes e 1,8 vezes maiores, respectivamente, com o uso das fontes sólidas quando comparados ao controle sem fontes adicionais de carbono. A suplementação de carbono também aumentou em 21% a porcentagem de sólidos voláteis da biomassa com o uso do bicarbonato e 20% com o uso do carbonato, indicando um potencial no uso de fontes sólidas como suplementação de cultivo de microalgas para produção de biocombustíveis.

Tanto a cepa de *Chlorella* sp. (L06) quanto o inóculo misto foram capazes de crescer em meio efluente com a adição de NaHCO_3 e CaCO_3 . A *Chlorella* sp. mostrou uma resposta positiva à suplementação com fontes sólidas quando comparado ao controle, com resultados equivalentes à suplementação convencional através de aeração (12h/dia). Entretanto, o inóculo misto não demonstrou um aumento significativo no seu crescimento para as formas de suplementação aplicadas.

O pH inicial do cultivo mostrou ser um parâmetro de importante consideração para viabilizar o uso de CaCO_3 como fonte de carbono no cultivo de *Chlorella* sp., fazendo-se necessária a inclusão da correção do pH em estudos de ACV e análise de custos deste método para otimização da produção de microalgas. A utilização do CO_2 pressurizado para correção do pH no início do cultivo com aporte de carbonatos permitiu, além de reduzir o pH e converter o carbonato para a forma assimilável (HCO_3^-), aumentar a concentração de carbono disponível a partir da fixação do CO_2 no meio alcalino. A longo do cultivo, a conversão gradativa do bicarbonato em carbonato também proporcionou um efeito tamponante, evitando o esgotamento de H^+ , essencial para o processo de concentração e utilização do carbono no interior da célula.

A inserção do CO_2 para correção do pH no início do experimento apresenta duas vantagens caso a suplementação com CaCO_3 seja utilizada: 1) Aumentar a concentração de carbono inorgânico do meio através da fixação de CO_2 ; e 2) Aumentar a biodisponibilidade do carbono inorgânico dissolvido através de sua conversão em íons HCO_3^- .

7 RECOMENDAÇÕES

Devido as oscilações na comunidade de microalgas em inóculos mistos, é recomendado um estudo mais profundo do efeito de diferentes concentrações das fontes sólidas utilizadas no crescimento de consórcios de microalgas, com cultivos consecutivos para aclimação da comunidade microalgácea, afim de definir as concentrações ótimas destes reagentes e os verdadeiros efeitos no crescimento microalgáceo em comunidades mistas.

Para avaliar a viabilidade do uso do carbonato de cálcio como forma alternativa ao aporte de CO₂ gasoso no cultivo de microalgas, são recomendados estudos de ACV incluindo a correção do pH após a adição do reagente, como através da inserção de CO₂, comparando os custos energéticos e eficiência na utilização de CO₂ por grama de biomassa produzida através de diferentes formas de suplementação.

Para estudos posteriores, é interessante avaliar o uso de fontes sólidas combinadas com o uso de CO₂ gasoso durante o cultivo, como em momentos onde o aumento do pH se torna o fator limitante devido a escassez de H⁺ e redução nas formas de carbono biodisponíveis. Neste caso, o uso do CO₂ atuaria na resuspensão de carbonatos precipitados e fixação de carbono no meio de cultivo na forma de bicarbonatos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 Ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2005.

ARIAS, D. M.; SOLÉ-BUNDÓ, M.; GARFÍ, M.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; UGGETTI, E. Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater. *Bioresource Technology*. v. 274, p.513-519, 2018.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, v. 28, p.64-70, 2006.

AVISO, K.B.; CAYAMANDA, C.D.; SOLIS, F.D.B.; DANGA, A.M.R.; PROMENTILLA, M.A.B.; YU, K.D.S.; SANTOS, J.R.; TAN, R.R. P-graph approach for GDP-optimal allocation of resources, commodities and capital in economic systems under climate change-induced crisis conditions. *Journal of Cleaner Production*, v.92, p.308-317, 2015.

BABA, M.; SHIRAIWA, Y. *High-CO₂ Response Mechanisms in Microalgae*. In: *Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects*. Dr Mohammad Najafpour (Ed.), ISBN: 978-953-307-928-8, InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-photosynthesis-fundamental-aspects/high-co2-response-mechanism-in-microalgae>.

BADGER, M. The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO₂ concentrating mechanisms. *Photosynthesis Research*, v. 77, p. 83-94, 2003.

BAHADAR, A. & KHAN, M.B. Progress in energy from microalgae: a review. *Renewable and Sustainable Reviews*, v.27, p.128-148, 2013.

BASTIDAS, O. *Cell Counting with Neubauer Chamber: Basic Hemocytometer Usage*. Technical Note - Neubauer Chamber Cell Counting. Disponível em: <<http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

BONAVENTURA, D.; CHACARTEGUI, R.; VALVERDE, J. M.; BECERRA, J. A.; ORTIZ, C.; LIZANA, J. Dry carbonate process for CO₂ capture and storage: Integration with solar thermal power. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 1796-1812, 2018.

BONAVENTURA, D.; CHACARTEGUI, R.; VALVERDE, J. M.; BECERRA, J. A.; VERDA, V. Carbon capture and utilization for sodium bicarbonate production

assisted by solar thermal power. *Energy Conversion and Management*, v. 149, p. 860-874, 2017.

BRASIL. *Diagnóstico dos serviços de Água e Esgotos – 2015*. In: Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS). Ministério das Cidades, Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. SNSA/MCIDADES, Brasília, 212 p., 2017.

BRASIL. *Resolução CONAMA nº430, de 13 de maio de 2011*. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União. Brasília, 2011.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 19, p. 360-369, 2013.

CARNEIRO, R. L.; ALÍPIO, A. C. N.; BISCH, P. M.; OLIVEIRA & AZEVEDO, S. M. F.; PACHECO, A. B. F. The inhibitory effect of calcium on *cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) metabolism. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p.1547-1559, 2011.

CASSINI, S. T.; FRANCISCO, S. A.; ANTUNES, P. W. P.; OSS, R. N.; KELLER, R. *et al.* Harvesting Microalgal Biomass grown in Anaerobic Sewage Treatment Effluent by the Coagulation-Flocculation Method: Effect of pH. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, [s.l.], v. 60, p.1-12, 2017.

CAVALCANTI, P. F. F.; HAANDEL, A. van; KATO, M. T.; SPERLING, M. von; LUDUVICE, M. L.; MONTEGGIA, L. O. *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento*. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Carlos Augusto Lemos Chernicharo (coord.), Projeto PROSAB, Belo Horizonte [s.n.]. cap. 3, p. 1-51, 2001.

CHERNICHARO, C. A. L.; HAANDEL, A. C. van; FORESTI, E.; CYBIS, L. F. *Introdução*. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios. Carlos Augusto Lemos Chernicharo (coord.), Projeto PROSAB, Belo Horizonte [s.n.]. cap. 1, p. 1-12, 2001.

CHI, Z.; O'FALLON, J. V.; CHEN, S. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends in Biotechnology*, v. 9, n. 11, p. 537-541, 2011.

CHO, D.; CHOI, J.; KANG, Z.; KIM, B.; OH, H.; KIM, H.; RAMANAN, R. Microalgal diversity fosters stable biomass productivity in open ponds treating wastewater. *Scientific Reports*, v. 1979 (7), p. 1–11, 2017.

DUBBER, D.; GRAY, N. F. Replacement of chemical oxygen demand (COD) with total organic carbon (TOC) for monitoring wastewater treatment performance to minimize disposal of toxic analytical waste. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, v. 45, p. 1595-1600, 2010.

EUSTANCE, E.; GARDNER, R. D.; MOLL, K. M.; MENICUCCI, J.; GERLACH, R.; PEYTON, B. M. Growth, nitrogen utilization and biodiesel potential for two chlorophytes grown on ammonium, nitrate or urea. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 1663-1677, 2013.

FAN, J.; YAN, C.; ANDRE, C.; SHANKLIN, J.; SCHWENDER, J.; XU, C. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiology*, v. 53, n. 8, p. 1380-1390, 2012.

FONTOURA, J. T.; ROLIM, G. S.; FAZENZENA, M.; GUTTERRES, M. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 111, p. 355-362, 2017.

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

GONÇALVES, A. L.; RODRIGUES, C. M.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. The effect of increasing CO₂ concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria. *Algal Research*, v. 14, p. 127-136, 2016.

GODDY, D.C.; LAPWORTH, D.J.; BENNET, S.A.; HEATON, T.H.E.; WILLIAMS, P.J.; SURRIDGE, B.W.J. A multi-stable isotope framework to understand eutrophication in aquatic ecosystems. *Water Research*, v.88, p.623-633, 2016.

GUO, Y.; YUAN, Z.; XU, J.; WANG, Z.; YUAN, T.; ZHOU, W.; XU, J.; LIANG, C.; XU, H.; LIU, S. Metabolic acclimation mechanism in microalgae developed for CO₂ capture from industrial flue gas. *Algal Research*, v. 26, p. 225-233, 2017.

HEMALATHA, M.; MOHAN, S. V. Microalgae cultivation as tertiary unit operation for treatment of pharmaceutical wastewater associated with lipid production. *Bioresource Technology*, v. 215, p.117-122, 2016.

HUSSAIN, F.; SHAH, S. Z.; ZHOU, W.; IQBAL, M. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology*, v. 170, p. 91-98, 2017.

KADAM, K. L. Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: economic impact of different process option. *Energy Convers. Manag.* v. 38, p. 505–510, 1997.

KIM, GA-YEONG; HEO, J.; KIM, HEE-SIK; HAN, JONG-IN. Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource technology*, v. 237, p. 72-77, 2017.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; FILHO, R. M. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 1376-1392, 2018.

KONST, P.; MIRELES, I. H.; STEL, R.; OS, P.; GOETHEER, E. Integrated system for capturing CO₂ as feedstock for algae production. *Energy Procedia*, v.114, p. 7126-7132, 2017.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, v. 10, p. 456-469, 2012.

LEE, S. L.; OH, H.; OH, H.; KIM, H.; AHN, C. Two-phase photoperiodic cultivation of algal–bacterial consortia for high biomass production and efficient nutrient removal from municipal wastewater. *Bioresource technology*, v. 200, p. 867-875, 2016.

LIN, T.S. & WU, J.Y. Effect of carbon sources on growth and lipid accumulation of newly isolated microalgae cultured under mixotrophic condition. *Bioresource Technology*, v.184, p.100-107, 2015.

MAIER, R.M. Bacterial growth. In: MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. (Eds). *Environmental Microbiology*. 2nd Ed. Burlington, California, London: Elsevier Academic Press, 2009. p.37-54.

MEDEIROS, D.L.; SALES, E.A.; KIPERSTOK, A. Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance. *Journal of Cleaner Production*, v.96, p.493-500, 2015.

MEDIPALLY, S. R.; YUSOFF, F. M.; BANERJEE, S.; SHARIFF, M. Microalgae as sustainable renewable energy feedstock for biofuel production. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

MEIER, L.; BARROS, P.; TORRES, A.; VILCHEZ, C.; JEISON, D. Photosynthetic biogas upgrading using microalgae: Effect of light/dark photoperiod. *Renewable Energy*, v. 106, p. 17-23, 2017.

MOKASHI, K.; SHETTY, V.; GEORGE, S. A.; SIBI, G. Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*. *Achievements in the Life Sciences*, v. 10, p. 111-117, 2016.

MYERS, J. A.; CURTIS, B. S.; CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, v. 6, n. 4, p. 1-15, 2013.

NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Research*, v. 16, p. 2016-223, 2016.

NAYAK, M.; SUH, W. I.; LEE, B.; CHANG, Y. K. Enhanced carbon utilization efficiency and FAME production of *Chlorella* sp. HS2 through combined supplementation of bicarbonate and carbon dioxide. *Energy Conversion and Management*, v. 156, p. 45-52, 2018.

NOAA. *Trends in atmospheric carbon dioxide; 2018*. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2018.

PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 315-323, 2015.

PASSOS, F.; GUTIÉRREZ, R.; UGGETTI, E.; GARFÍ, M.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Towards energy neutral microalgae-based wastewater treatment plants. *Algal Research*, v. 28, p. 235-243, 2017.

PERAZZOLI, S.; BRUCHEZ, B.M.; MICHELON, W.; STEINMETZ, L.R.L.; MEZZARI, M.P.; NUNES, E.O.; SILVA, M.L.B. Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of *Scenedesmus* spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 109, p.23-28, 2016.

PEREIRA, M. V.; DASSOLER, A. F.; ANTUNES, P. W.; GONÇALVES, R. F.; CASSINI, S. T. Indigenous microalgae biomass cultivation in continuous reactor with anaerobic effluent: effect of dilution rate on productivity, nutrient removal and

bioindicators. *Environmental Technology*, DOI: 10.1080/09593330.2018.1549105, 2018.

PIIPARINEN, J.; BARTH, D.; ERIKSEN, N. T.; TEIR, S.; SPILLING, K.; WIEBE, M. G. Microalgal CO₂ capture at extreme pH values. *Algal Research*, v. 32, p. 321-328, 2018.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, v. 88, p.3411-3424, 2011.

RAZZAK, S. A.; ALI, S. A. M.; HOSSAIN, M. M.; DeLASA, H. Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 76, p. 379-390, 2017.

REDFIELD, A. C. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist*, v. 46, p. 205-221, 1958.

RENUKA, N.; SOOD, A.; RATHA, S. K.; PRASANNA, R.; AHLUWALIA, A. S. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p.1529-1537, 2013.

ROGERS, J.; ROSENBERG, J.; GUZMAN, B.; OH, V.; MIMBELA, L.; GHASSEMI, A.; BETENBAUGH, M.; OYLER, G.; DONOHUE, M. A critical analysis of paddlewheel-driven raceway ponds for algae biofuel production at commercial scales. *Algal Research*, v.4, p.76-88, 2014.

SAJJADI, B. S.; CHEN, W.; RAMAN, A. A. A.; IBRAHIM, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.98, p. 200-232, 2018.

SAYRE, R. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *BioScience*, v. 60, n. 9, p. 722-727, 2010.

SINGH, S. K.; SUNDARAM, S.; SINHA, S.; RAHMAN, M. A.; KAPUR, S. Recent advances in CO₂ uptake and fixation mechanism of cyanobacteria and microalgae. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 16, p. 1297-1323, 2016.

SMITH, V. H.; SCHINDLER, D. W. Eutrophication science: where do we go from here? *Trends in Ecology and Evolution*, v. 24, n. 4, p. 201-207, 2009.

SPERLING, M. V. *Urban wastewater treatment in Brazil*. In: TECHNICAL NOTE Nº IDB-TN-970. Inter-American Development Bank, 101 p., 2016.

STRAKA, L.; RITTMANN, B. E. Light-dependent kinetic model for microalgae experiencing photoacclimation, photodamage, and photodamage repair. *Algal Research*, v. 31, p.232-238, 2018.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H.H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.55, p.909-941, 2016.

SUKAČOVÁ, K.; TRTÍLEK, M.; RATAJ, T. Phosphorus removal using a microalgal biofilm in a new biofilm photobioreactor for tertiary wastewater treatment. *Water Research*, v. 71, p. 55-63, 2015.

TAKESHITA, T.; OTA, S.; YAMAZAKI, T.; HIRATA, A.; ZACHLEDER, V.; KAWANO, S. Starch and lipid accumulation in eight strains of six *Chlorella* species under comparatively high light intensity and aeration culture conditions. *Bioresource Technology*, v.158, p.127-134, 2014.

TORRES, H. S. J.; *Cultivo de microalgas em efluente de tratamento anaeróbico de esgoto*. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 187 p., 2014.

TU, Z.; LIU, L.; LIN, W.; XIE, Z.; LUO, J. Potential of using sodium bicarbonate as external carbon source to cultivate microalga in non-sterile condition. *Bioresource Technology*, v. 266, p. 109-115, 2018.

WHITE, D. A.; PAGARETTE, A.; ROOKS, P.; ALI, S.T. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.*, v. 25, p. 153–165, 2013.

WINK, F. V.; MELO, D. O. P.; BARRIOS, A. F. G. Carbon acquisition and accumulation in microalgae *Chlamydomonas*: Insights from “omics” approaches. *Journal of Proteomics*, v. 94, p. 207-218, 2013.

WOOD, A.M.; EVERROAD, R.C.; WINGARD, L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: ANDERSEN, R.A. (Ed). *Algal Culturing Techniques*. London: Elsevier Academic Press, 2005. p. 269-287.

XIE, T.; WU, Y. The role of microalgae and their carbonic anhydrase on the biological dissolution of limestone. *Environmental Earth Sciences*, v. 71, p. 5231-5239, 2014.

ZAWAR, P.; JAVALKOTE, V.; BURNAP, R.; MAHULIKAR, P.; PURANIK, P. CO₂ capture using limestone for cultivation of the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* PAZ and the cyanobacterium *Arthrospira* sp. VSJ. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 498-509, 2016.

ZHAO, Z.; SONG, X.; WANG, W.; XIAO, Y.; GONG, Z.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; CHEN, Y.; MEI, M. Influences of iron and calcium carbonate on wastewater treatment performances of algae based reactors. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 1-11, 2016.

ZHU, B.; CHEN, G.; CAO, X.; WEI, D. Molecular characterization of CO₂ sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. *Bioresource Technology*, v. 244, p.1207-1215, 2017.