

# **Tratamento de efluentes industriais pela microalga *Selenastrum* sp.: Avaliação do potencial biotecnológico e ambiental**

**Bruno Pimenta Escobar**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotecnologia**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Rogério Simões

**Outubro de 2021**



# Agradecimentos

Quero agradecer a todos que me auxiliaram, tanto presencialmente quanto a distância, na produção desta tese para obtenção do grau de Mestre.

Ao professor Rogério Simões, que com seu entusiasmo, conhecimento e didática me possibilitou esta oportunidade de trabalhar consigo e obter inestimáveis experiências.

Ao meu amigo André Cunha, que acompanhou de perto os procedimentos experimentais e teóricos, e que me auxiliou em tantas etapas, tanto no acadêmico quanto no convívio.

A minha esposa, que apesar da distância sempre me apoiou e me incentivou a continuar me esforçando, sempre compartilhando seu amor e carinho.

A minha família, onde além de me apoiar, também me possibilitaram esta oportunidade para estudar no estrangeiro, apesar das dificuldades e da saudade.

A todos os meus amigos e colegas que conheci, interagi, trabalhei, estudei e convivi durante este período, que me proporcionaram experiências inesquecíveis.

Aos meus professores, que repassaram seus conhecimentos e técnicas e me acompanharam diariamente em minha trajetória acadêmica.

Muito obrigado a todos as pessoas que fizeram parte da minha vida nestes últimos 2 anos, nossas interações me fizeram o que sou hoje, e no momento, eu sou feliz.



## Resumo

Com as necessidades energéticas e de água limpa, tanto para uso doméstico quanto industrial, sempre a crescer, o impacto ambiental gerado e a necessidade de o reverter, tem-se procurado alternativas que sejam ecológicas, eficientes e de baixo custo. As microalgas podem ser uma dessas alternativas. As microalgas são microrganismos encontrados em muitos tipos de ambientes, capazes de uma reprodução rápida; de se adaptar ao ambiente em que se encontra e altera-lo; e são fontes de diversos compostos de interesse, tanto para energia verde quanto para os setores alimentares e farmacêuticos.

O presente trabalho visa analisar a aclimação da microalga *Selenastrum sp.* em efluentes industriais (têxtil e da pasta para papel), avaliar o tratamento de matéria orgânica biodegradável e observar a acumulação de compostos de interesse na biomassa. Para tal, realizaram-se cultivos em reatores de 1L durante 8 dias, com controlo da intensidade luminosa (195 de  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 12h/dia), temperatura (23°C) e fluxo de ar (0,4L/L/min) filtrado. Cada cultivo tinha uma concentração de 90% (v/v) de efluente filtrado, além dos cultivos controlo com e sem adição de glucose para comparação de desenvolvimento da biomassa e eliminação de matéria orgânica respetivamente. Devido aos baixos teores de nutrientes inorgânicos nos efluentes, em todos os cultivos foram adicionados 10mL de GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS). Amostras para contagem de células, análise de carência química de oxigénio (CQO), peso seco, dimensões celulares e leituras em espectrofotómetro (200 – 800nm) foram feitos em 4 alturas do cultivo.

Após o cultivo, obteve-se uma redução de níveis da CQO de 70%, 64,3% e 49,2% para os cultivos com glucose, efluente da pasta para papel e efluente têxtil, respetivamente, além de uma redução média de 31,7% nos compostos solúveis que absorvem no UV-Visível. A esta atividade de bioconversão dos compostos dissolvidos correspondeu um crescimento de 9,8 milhões de células por mL em média nos cultivos. Relativamente à quantidade de biomassa gerada, face ao valor obtido para o cultivo controlo (0,29mg/mL), verificou-se um incremento de 76,7% no cultivo com glucose, 62,8% no cultivo com efluente da pasta para papel e de 46,5% no cultivo com efluente têxtil.

Estas observações permitem concluir que a *Selenastrum sp.* é uma eficiente alternativa para tratamento de efluentes industriais, e devido ao seu crescimento e capacidade de acumular biomassa apresenta um potencial suplementar como fonte de compostos úteis.

## Palavras-chave

Microalga; *Selenastrum sp.*; Efluente industrial; Efluente têxtil; Efluente da pasta para papel; Tratamento de efluentes.



## Abstract

With the energy and clean water needs, both for domestic and industrial uses, always growing, the environmental impact generated and the need to reverse them, alternatives that are ecological, efficient, and low cost have been sought. Microalgae can be one of those alternatives. Microalgae are microorganisms found in almost all types of aqueous media, capable of rapid reproduction, adapting and changing the environment and are sources of various compounds of interest, both for green energy and for the food and pharmaceutical sectors.

The present work aims to analyze the acclimatization of the microalgae *Selenastrum sp.* in effluents from the textile and paper pulp industry, evaluate the treatment and elimination of biodegradable organic matter and observe the accumulation of compounds of interest. For this purpose, cultures were carried out in 1L reactors for 8 days, with control of light intensity ( $195 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , 12h/day), temperature ( $23^\circ\text{C}$ ) and filtered air flow ( $0,4\text{L}/\text{L}/\text{min}$ ). Each culture had a concentration of 90% (v/v) of filtered effluent, in addition to the control and control cultures with addition of glucose for comparison of biomass development and organic matter elimination, respectively. Due to the low inorganic nutrient content in the effluents, 10mL of GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS) were added to all cultures. Samples for cell counting, chemical oxygen demand (COD) analysis, dry weight, cell dimensions and spectrophotometer readings (200 – 800nm) were taken at 4 different times of cultivation.

After cultivation, there was a reduction in COD levels of 70%, 64.3% and 49.2% for cultures with glucose, pulp effluent and textile effluent respectively, in addition to an average reduction of 31.7% in total compounds dissolved in the medium, according to UV-Visible analysis. This bioconversion activity resulted in a growth of 9.8 million cells per mL on average in the cultures. Regarding the amount of biomass accumulated, using the control culture as reference ( $0.29\text{mg}/\text{mL}$ ), increment of 76.7% was observed for the cultivation with glucose, 62.8% for the pulp effluent and 46.5% for the textile effluent.

These observations enable to conclude that *Selenastrum sp.* is an efficient alternative for the treatment of industrial effluents, and due to its growth and capacity to accumulate biomass exhibit an additional potential as source of useful compounds.

## Keywords

Microalgae; *Selenastrum sp.*; Industrial effluent; Textile effluent; Pulp effluent; Wastewater treatment.





# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Enquadramento do trabalho.....	1
1.2.	Objetivo do trabalho .....	3
1.3.	Estrutura do trabalho.....	3
2.	Revisão Bibliográfica .....	3
2.1.	Microalgas .....	3
2.1.1.	Gênero <i>Selenastrum</i> .....	4
2.2.	Produção de biomassa .....	6
2.3.	Compostos de interesse comercial e sua produção .....	6
2.3.1.	Pigmentos .....	6
2.3.2.	Proteínas .....	8
2.3.3.	Lipídeos .....	9
2.3.4.	Outros compostos e produtos .....	11
2.4.	Consórcio de bactérias e microalgas.....	11
2.5.	Condições de estresse.....	12
2.6.	Tratamentos de efluentes.....	14
2.7.	Condições de cultura .....	16
2.7.1.	Luminosidade .....	16
2.7.2.	Temperatura .....	17
2.7.3.	Carbono.....	17
2.7.4.	Azoto e fósforo .....	17
2.7.5.	Outros nutrientes .....	18
2.7.6.	pH .....	18
2.7.7.	Agitação .....	18
2.8.	Tipos de biorreatores .....	18
2.8.1.	Fotobiorreatores fechados.....	19
2.8.2.	Open pond ou raceways (lagoas abertas / lagoas de pista) .....	20
2.8.3.	Outros tipos de sistemas .....	21
2.9.	Processamento da biomassa .....	21
2.9.1.	Físico.....	22
2.9.2.	Químico.....	23

2.9.3. Biológico .....	23
2.10. Recuperação da biomassa .....	24
2.10.1. Físico.....	24
2.10.2. Químico .....	24
2.10.3. Biológico .....	25
2.11. Efluentes industriais.....	25
2.11.1. Regras, qualidade da água, propriedades e estatutos.....	25
2.11.2. Efluente da indústria do papel.....	26
2.11.3. Efluente da Indústria têxtil .....	28
3. Materiais e métodos .....	31
3.1. Materiais .....	31
3.1.1. Reagentes .....	31
3.1.2. Microalga, meio de cultura e efluentes .....	31
3.1.3. Instalação .....	33
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Produção de biomassa algal .....	35
3.2.1.1. Ensaio preliminares.....	36
3.2.1.2. Ensaio principal em reator de 1L .....	38
3.2.2. Controlo do processo.....	40
3.2.2.1. Biomassa.....	40
3.2.2.2. Luminosidade .....	42
3.2.2.3. Temperatura, fontes de carbono e outros parâmetros .....	43
3.2.3. Análise de matéria orgânica e outros compostos .....	45
3.2.3.1. Carência química de oxigénio .....	46
3.2.3.2. Análise UV-visível de meio filtrado.....	48
4. Resultados e discussão .....	50
4.1. Resultados dos ensaios preliminares .....	50
4.2. Resultados do desenvolvimento da biomassa nos ensaios principais ..55	
4.2.1. Biomassa nos cultivos controlo.....	57
4.2.2. Biomassa nos cultivos de efluente têxtil .....	59
4.2.3. Biomassa nos cultivos de efluente da pasta para papel.....	62
4.2.4. Biomassa nos cultivos com Glucose.....	64
4.2.5. Comparação do crescimento de biomassa nos diferentes cultivos	66
4.3. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível .....	68

4.3.1. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível na biomassa controle.....	69
4.3.2. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no efluente têxtil .	69
4.3.3. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no efluente da pasta para papel .....	70
4.3.4. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no ensaio com glucose. ....	71
4.3.5. Comparação de tratamento de efluentes dos cultivos .....	72
5. Conclusão e perspectivas futuras.....	74
6. Referências.....	75



## Lista de Figuras

- Figura 1 – Componentes encontrados em microalgas (modificado de Aliyu et al., e suas respectivas referências)
- Figura 2 – Possíveis rotas para o aproveitamento da biomassa de microalgas para diferentes aplicações (modificado de Sudhakar et al., e suas respectivas referências)
- Figura 3 – Diagrama de fluxo resumido para uma biorefinaria de microalgas e suas aplicações industriais (modificado de Bhattacharya et al., e suas respectivas referências)
- Figura 4 – Diferentes aplicações para lipídeos provenientes de biomassa de microalgas (modificado de Ferreira et al., e suas respectivas referências)
- Figura 5 – Parâmetros abióticos envolvidos na produção de biomassa de microalgas (modificado de Ananthia et al.125, e suas respectivas referências)
- Figura 6 – Diagrama esquemático para sistemas convencionas para tratamento de efluentes (modificado de Mohsenpour et al.132, e suas respectivas referências).
- Figura 7 – Processos de tratamento de efluentes (modificado de Rawat et al.135, e suas respectivas referências).
- Figura 8 – Componentes típicos de uma parede celular de uma microalga (modificado de Ananthia et al.125, e suas respectivas referências).
- Figura 9 – Esquemática demonstrando os tipos de pré-tratamento físicos para biomassa de microalgas (modificado de Ananthia et al.125, e suas respectivas referências).
- Figura 10 – Principais poluentes descartados em cada etapa dos processos têxteis húmidos (modificado de Yaseen et al.213, e suas respectivas referências).
- Figura 11 – Métodos utilizados para remoção de corantes em efluentes (modificado de Samsami et al.214, e suas respectivas referências).
- Figura 12 – *Selenastrum* sp. aproximado em 40x.
- Figura 13 – Efluentes filtrados da pasta para papel e têxtil, da esquerda para direita respectivamente.
- Figura 14 – Estante para cultura de microalgas.
- Figura 15 – Filtros de nylon e válvulas utilizadas na limpeza e controlo do fluxo de ar.
- Figura 16 – Diferentes etapas de cultivo da microalga *Selenastrum* sp..
- Figura 17 – Ensaio preliminar para a sobrevivência da *Selenastrum* sp..
- Figura 18 – Ensaio preliminar para o crescimento da *Selenastrum* sp..
- Figura 19 – Ensaio e cultivo principal da *Selenastrum* sp..
- Figura 20 – Ensaio principal com réplicas para controlo e efluente têxtil; e com o cultivo controlo com adição de glucose.
- Figura 21 – Microscópio e aplicações utilizados durante os procedimentos.

Figura 22 - Obtenção do diâmetro (diâmetro é igual ao raio x2) e do comprimento da microalga.

Figura 23 – Pesagem de biomassa seca.

Figura 24 – Sistema de LEDS utilizado nos cultivos.

Figura 25 – Sistema de controlo da temperatura em uso.

Figura 26 – Kits para análise de fosfato e nitrato, da esquerda para direita, respetivamente.

Figura 27 – Resultados do kit para fosfatos em azul e nitratos em vermelho.

Figura 28 – Amostras dos cultivos filtradas, diluídas e com adição de ácido sulfúrico respetivamente.

Figura 29 – Etapa de digestão a 150°C para determinação da CQO.

Figura 30 – Sistema de titulação utilizado para determinação da CQO.

Figura 31 – Espectrofotómetro utilizado na etapa de análise do UV-visível.

Figura 32 – Resultados de uma leitura do UV-Visível.

Figura 33 – Ensaio preliminares para sobrevivência da microalga em efluentes.

Figura 34 – Remoção da CQO, face ao valor inicial (2 horas de cultivo). Valores positivos indicam remoção e valores negativos indicam aumento na matéria orgânica.

Figura 35 - Evolução temporal do número de células por mL, para o ensaio controlo, efluente têxtil, da pasta tal qual e pasta diluída.

Figura 36 - Concentração mássica de biomassa algal ao cabo de 15 dias de cultivo, em diferentes efluentes e ensaio controlo (concentração inicial = 0,01 mg/mL; ensaios em duplicata).

Figuras 37 e 38 - Evolução temporal do oxigénio dissolvido e pH do meio para a média dos ensaios (medidos ao final do dia).

Figuras 39 e 40 – Outras espécies de microalgas encontradas durante o cultivo.

Figura 41 – Bactérias registadas durante o cultivo.

Figura 42 – Ensaio definitivos de microalgas em efluentes (C: controlo; T: têxtil; P: pasta para papel).

Figura 43 – Procedimentos de filtração, diluição, preparo para contagem e sonicação.

Figura 44 – Ensaio definitivos de microalgas, réplicas e cultivo com glucose.

Figura 45 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio controlo.

Figura 46 - Dimensões das microalgas no início do ensaio controlo.

Figura 47 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio controlo.

Figura 48 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio com efluente têxtil.

Figura 49 - Dimensões das microalgas no início do ensaio no efluente têxtil.

Figura 50 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio no efluente têxtil.

Figura 51 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio com efluente da pasta para papel.

Figura 52 - Dimensões das microalgas no início do ensaio no efluente da pasta para papel.

Figura 53 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio no efluente da pasta para papel.

Figura 54 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio controle com adição de glucose.

Figura 55 - Dimensões das microalgas no início do ensaio controle com glucose.

Figura 56 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio controle com glucose.

Figura 57 - Comparação entre o crescimento de *Selenastrum* sp. nos diferentes cultivos em escala linear

Figura 58 - Comparação entre o aumento de biomassa seca de *Selenastrum* sp. nos diferentes cultivos em escala linear.

Figura 59 - Comparação entre o aumento da massa celular de *Selenastrum* sp. nos diferentes cultivos em escala linear.

Figura 60 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos controles.

Figura 61 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos com efluente têxtil.

Figura 62 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos com efluente da pasta papel.

Figura 63 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos controles com adição de glucose.

Figura 64 - Comparação entre a variação da CQO nos diferentes cultivos em escala linear.

Figura 65 - Comparação entre os valores da integral de absorção (200 a 800nm) nos diferentes cultivos em escala linear.





# Lista de Tabelas

Tabela 1 – Resumo das principais interações entre microalgas e bactérias na remoção de nutrientes (modificado de Fallahi et al., e suas respectivas referências)

Tabela 2 – Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas (modificado de Yina et al.173, e suas respectivas referências).

Tabela 3 – Valores limite de emissão na descarga de águas residuais (modificado de Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto198, e suas respectivas referências).

Tabela 4 – Parâmetros típicos de efluentes provenientes de diferentes processos na indústria da pasta e de papel (modificado de Kamali et al.200, Ashrafi et al.204, Toczyłowska-Mamińska202 e suas respectivas referências).

Tabela 5 – Características de efluentes da indústria têxtil de acordo com seus respectivos processos (modificado de Ghaly et al.209, Yaseen et al.213 e suas respectivas referências).



## Lista de Acrónimos

CQO	Carência Química de Oxigênio
PUFAs	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
EPA	Ácido Ecosanoico
DHA	Ácido Docosahexanoico
GLA	Ácido Linoleico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
NaCl	Cloreto de Sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
Ca	Cálcio
P	Fósforo
N	Azoto
Mg	Magnésio
Z	Zinco
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Ni	Níquel
Mn	Manganês
UE	União Europeia
BBM	Bold Basal Medium
UV-Visível	Ultravioleta – Visível
FAS	Sulfato de Amônio Ferroso
LED	Díodo emissor de luz
GM-FWS	Fresh-Water species GoldenMedium



# 1. Introdução

O aumento da capacidade industrial e a produção dos mais variados bens de consumo, causam a escassez das matérias-primas, altos consumos de energia e poluem o ambiente de diversas formas.

Apesar das tecnologias e metodologias que utilizam microalgas serem inovadoras e ambiciosas, elas ainda se encontram na sua infância, utilizando ainda conceitos convencionais que limitam a sua capacidade ou inibem algumas de suas vantagens.

Este trabalho procura comprovar os benefícios das microalgas para diferentes setores da economia, a sua capacidade de adaptação e demonstrar que microalgas podem limpar poluentes, gerar energia e servir como matéria-prima, o melhor exemplo do conceito de bio-refinarias, onde problemas como poluentes se transformam em soluções e produtos.

## 1.1. Enquadramento do trabalho

As microalgas são organismos microscópicos capazes de crescer e dobrar o seu número de indivíduos em poucos dias, seja em meios aquosos salgados, doces, contaminados ou não, podendo transformar luz solar, fósforo e azoto em importantes metabolitos para a sua sobrevivência, os quais também podem ser usados nos mais diversos setores industriais e económicos, seja na área medicinal ou na energética. A pluralidade de opções, produtos e serviços que as microalgas oferecem são essenciais num período em que buscamos soluções amigas do ambiente, capazes de produzir bens de consumo de forma eficiente, sustentável e acessíveis.

Em setembro de 2015, na Assembleia Geral das Nações Unidas aprovou-se a Agenda 2030 para um desenvolvimento sustentável global, sendo algumas das suas principais prerrogativas o acesso a água, saneamento e fontes de energia eficientes e sustentáveis para todos, estando implícitos nessas prerrogativas a diminuição da poluição e contaminação das águas e o aumento da infraestrutura tecnológica para o desenvolvimento de energias sustentáveis<sup>1</sup>.

O uso de microalgas para os mais variados fins (desde o tratamento de águas contaminadas até à produção de combustíveis e fármacos) tem crescido, respondendo à procura, suportado pelas pesquisas envolvendo a sua utilização<sup>2</sup>. O bioetanol é o biocombustível mais produzido no mundo, sendo proveniente do milho ou da cana-de-açúcar<sup>3</sup>, porém estes sistemas dependem de grandes áreas para sua produção e competem com o setor de alimentos; assim, as algas possuem a vantagem de poderem produzir bioetanol em uma menor área sem competir com o setor alimentício<sup>4</sup>.

Outra questão muito debatida na produção de biocombustíveis é o consumo excessivo de água para poder alcançar o produto final, tanto na produção por sistemas agrícolas<sup>5</sup> como por algas<sup>6,7</sup>. Uma solução interessante é utilizar águas residuais para suprir estas necessidades, sendo uma eficiente e sustentável forma de cultivo, especialmente para microalgas já que estas podem crescer em vários tipos de águas contaminadas e ainda serem úteis para a produção de energia<sup>6-10</sup>.

Com o intuito de diminuir o impacto causado por efluentes industriais e domésticos quando liberados no ambiente ou visando a sua reutilização, as metodologias para o tratamento de águas residuais geralmente incluem as seguintes fases: tratamento preliminar, tratamento primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar trata da remoção de materiais de grande porte, normalmente através de triagens grosseiras; seguidamente, o tratamento primário busca remover materiais depositáveis através da sedimentação e também da remoção sólidos flutuantes; com o intuito de remoção de matéria orgânica residual e sólidos suspensos, o tratamento secundário consiste em remove-los através da aplicação de microrganismos aeróbicos; por fim, a terceira fase de tratamentos envolve a remoção de nutrientes (principalmente azoto e fósforo) e outros sólidos dissolvidos, comumente havendo um tratamento específico para cada constituinte<sup>11</sup>.

Quando se utiliza microalgas para tratamento de águas residuais, dois métodos são os mais usados: a lagoa de estabilização e a lagoa de estabilização integrada. Na primeira opção trata-se de uma única lagoa, onde bactérias em simbiose com as algas estabilizam a água poluída e reduzem os patogênicos; a segunda funciona da mesma forma, porém são quatro lagoas e cada uma com uma fase e tratamento diferente provendo vários tipos de tratamentos<sup>12</sup>.

A obtenção de álcool através de biomassa é uma técnica já há muito tempo conhecida, envolvendo a hidrólise do amido para a liberação de glicose para então esta ser fermentada e produzir o álcool. No caso das microalgas o processo é basicamente o mesmo, porém para a produção de biocombustível em massa, é necessário sempre uma eficiência máxima e minimizar os custos de produção.

Apesar da eclética capacidade das microalgas de serem adaptadas e aproveitadas para diferentes fins, o custo de produção e manutenção (seja económico ou o ambiental) destas microalgas muitas vezes é superior ao valor gerado. Devido a tal fato, o foco tem sido no aumento da sua eficiência, diminuição de custos de exploração, e principalmente aproveitar todos os seus recursos, desde o tratamento de efluentes, à produção de biocombustíveis, de ração animal, cosméticos e de fármacos. Os próximos estudos devem focar-se nas interações e nas complexidades de cada etapa de produção e respetivos efeitos nos produtos esperados.

## **1.2. Objetivo do trabalho**

Considerando o que foi exposto, é de grande interesse criar um sistema onde se aproveitam todos os recursos. Para tal são necessários estudos em todas as etapas de produção, desde o cultivo até ao produto final, considerando cada variável que possa afetar tanto positivamente quanto negativamente.

Neste trabalho busca-se analisar a adaptação da microalga *Selenastrum sp.* em efluentes industriais, a sua capacidade de tratamento dos efluentes e possível acumulação de compostos interessantes para usos futuros (bioenergia, produtos químicos, fertilizantes e etc).

## **1.3. Estrutura do trabalho**

Com os objetivos definidos e uma breve introdução às microalgas e seu potencial, segue-se:

**Capítulo 2** – Revisão da literatura sobre as diferentes temáticas abordadas;

**Capítulo 3** - Materiais e métodos;

**Capítulo 4** – Resultados e respetiva discussão;

**Capítulo 5** – Conclusões e perspectivas futuras;

**Capítulo 6** - Referências Bibliográfica

# **2. Revisão Bibliográfica**

Neste capítulo, desenvolvem-se algumas das principais temáticas para o trabalho, através da revisão bibliográfica.

Este capítulo permite um enquadramento mais completo na cultura de microalgas desde a física dos biorreatores, às aplicações dos produtos nas diversas áreas.

## **2.1. Microalgas**

As microalgas são seres unicelulares com grandes capacidades de produção de compostos bioativos interessantes para a nutrição e saúde humana e animal, além de serem capazes de gerar produtos energéticos, tratamentos de efluentes, etc. Estão presentes há milhares de anos em nosso planeta, são responsáveis por vários ciclos biológicos e químicos no planeta, desde serem a base da cadeia alimentar até a geração de oxigênio<sup>13</sup>. São considerados os organismos (vegetal) que crescem mais

rapidamente<sup>14</sup>, podendo ser encontrados nos mais variados tipos de habitat, seja em meio líquido, sólido<sup>15</sup> e até mesmo no ar<sup>16</sup>.

Estes seres microscópicos possuem a capacidade de se multiplicarem e crescerem de forma eficiente mesmo em condições muito poluídas, inclusive sendo usado para tratamento de efluentes<sup>17,18</sup>. Estas características beneficiam tanto o meio ambiente quanto a geração de produtos e serviços para a humanidade, promovendo uma economia circular de reciclagem e reaproveitamento de efluentes para a geração de remédios, suplementos, aditivos, produtos químicos e limpeza de efluentes, tudo isso com a força de bilhões de microalgas.

A sua principal fonte de energia é a radiação solar, onde através da fotossíntese transformam a energia solar e dióxido de carbono em oxigênio e glucose, necessitando adicionalmente de alguns compostos inorgânicos para sobreviver; esta forma é conhecida como autotrófica. No entanto, várias espécies de algas são heterotróficas, ou ainda mistas, tendo a capacidade de obter energia e nutrientes do próprio meio em que se encontram, sendo necessário absorver compostos orgânicos e inorgânicos disponíveis no ambiente, no entanto, ainda depende de luz para manutenção do seu metabolismo<sup>19</sup>.

Para um crescimento ideal, para a maioria das espécies de microalgas, é necessário um mínimo de condições, além dos nutrientes, é necessário um pH neutro ou levemente básico (entre 7 e 9), temperaturas entre 15 e 35 °C, luz entre 50 e 200  $\mu\text{mol}$  de fótons/ $\text{m}^2/\text{s}$ , e uma fonte de carbono (entre 1 2 % v/v)<sup>20</sup>.

Os produtos mais almejados nas microalgas são os biocombustíveis, devido à sua procura e relevância, e os carotenoides, pela sua capacidade como nutracêutico e alto valor agregado.

Carotenoides são pigmentos lipofílicos com inúmeras propriedades terapêuticas<sup>21</sup>, entre elas anti-inflamatórios (canthaxantina)<sup>22</sup>, antioxidantes (astaxantina)<sup>23</sup>, anti-câncer (betacaroteno)<sup>24</sup>, prevenção de doenças (luteína)<sup>25</sup> e várias outras características e carotenoides<sup>26,27,28</sup>.

No setor energético, o potencial das microalgas é diverso, dependendo apenas das propriedades das algas e do processo químico de transformação que irão definir a melhor forma de aproveitamento energético. A biomassa pode ser objeto de vários tipos de transformações: processos bioquímicos (com carboidratos como sua principal matéria-prima) gerando bioetanol, biogás e bio-hidrogênio, processos termoquímicos (onde toda a biomassa é transformada) podendo gerar desde bio-óleo, syngas até bio-eletricidade e por fim transesterificação (com lípidos como sua principal matéria-prima) gerando biodiesel<sup>29</sup>.



Para além destes produtos, ainda existem muitas outras formas de aproveitar as microalgas, seja na nutrição animal, humana ou piscicultura, como fertilizante, suplementos, cosméticos, lubrificantes, corantes, tratamento de efluentes e etc<sup>30,31</sup>. As figuras 1, 2 e 3 ilustram a composição, as aplicações e a biorrefinaria com base na biomassa algal respetivamente.

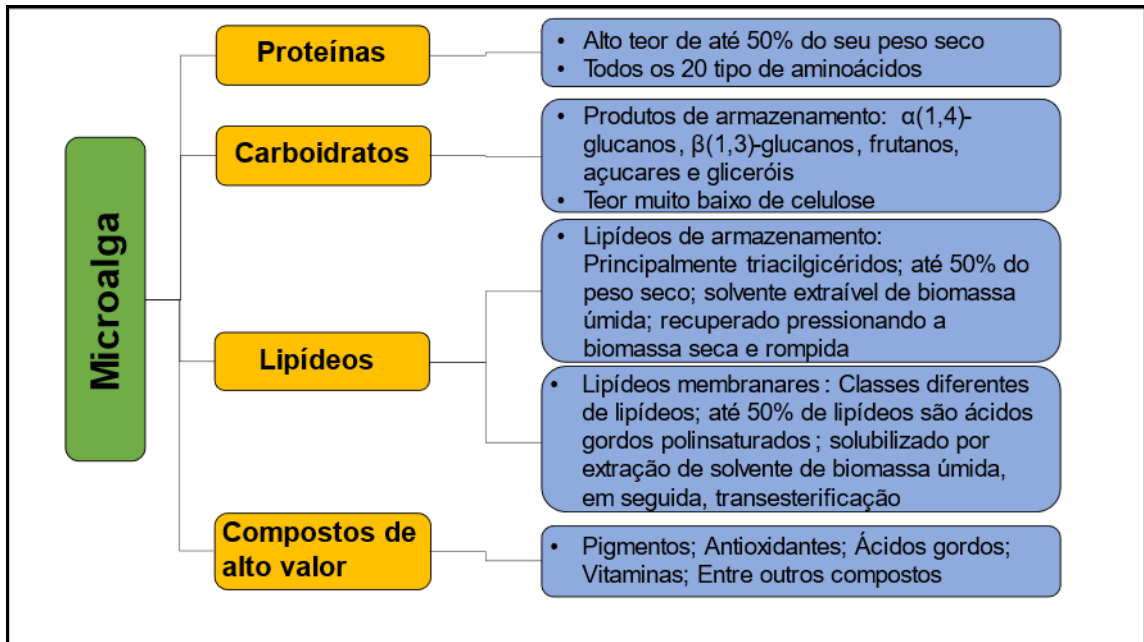


Figura 1 – Componentes encontrados em microalgas (modificado de Aliyu et al., e suas respectivas referências)<sup>32</sup>.

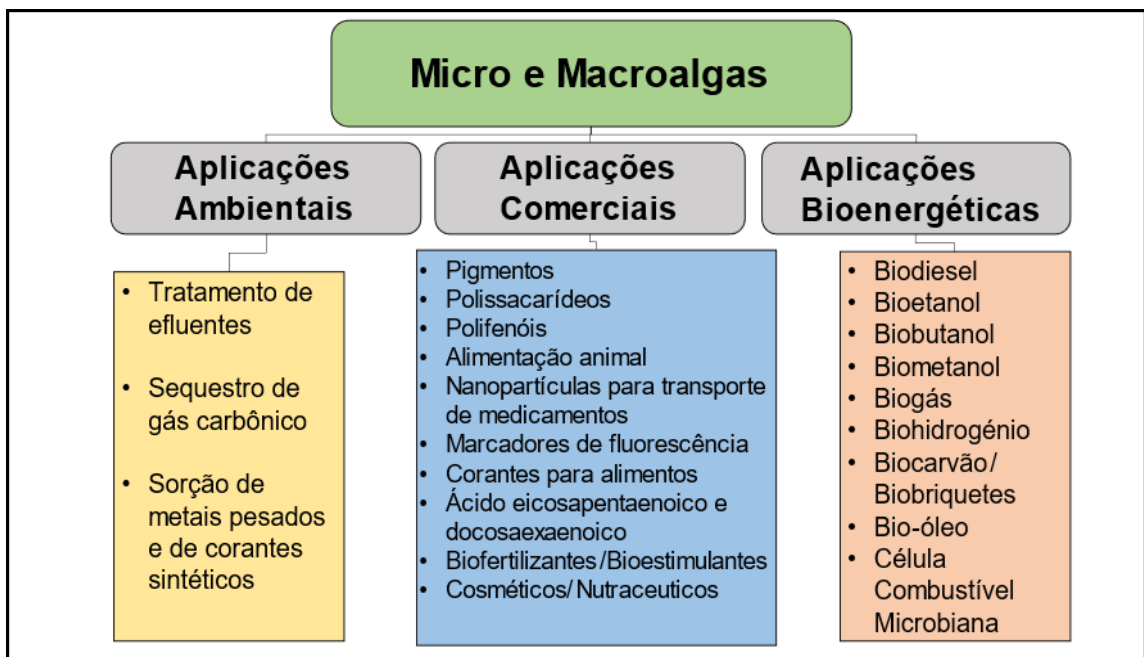


Figura 2 – Possíveis rotas para o aproveitamento da biomassa de microalgas para diferentes aplicações (modificado de Sudhakar et al., e suas respectivas referências)<sup>29</sup>.

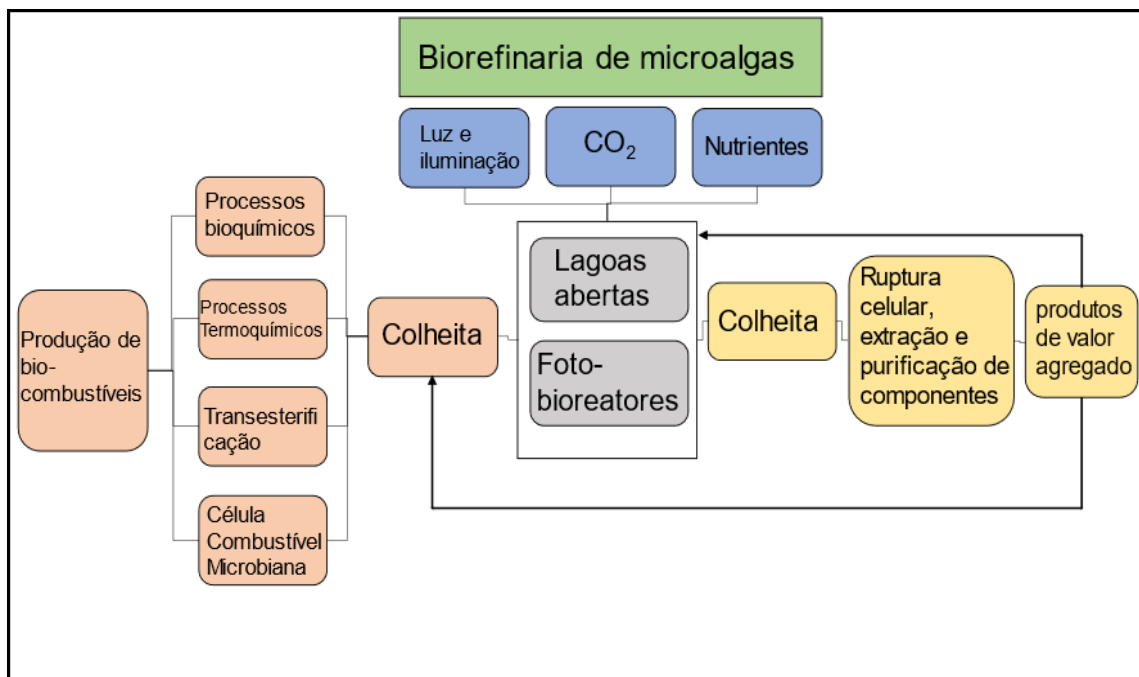


Figura 3 – Diagrama de fluxo resumido para uma biorefinaria de microalgas e suas aplicações industriais (modificado de Bhattacharya et al., e suas respectivas referências)<sup>30</sup>.

### 2.1.1. Gênero *Selenastrum*

As microalgas do gênero *Selenastrum*, foram primeiro descritas por Reinsch em 1866<sup>33</sup> na região da Francônia na Alemanha, onde o autor observou dois tipos de algas com características similares: células semilunares ou em formato de foice, ângulos esticados, unidas dorsalmente formando pequenas colônias ou agregados de 2, 4, 8 ou mais células e algumas solitárias, dimensões variando entre 7-42 x 1,5-8 micrômetros. Estas observações e as feitas por outros autores, tais como a reprodução por esporos e um único cloroplasto, são consideradas as principais definições para este gênero de microalga.

Atualmente, são aceitas taxonomicamente apenas quatro espécies dentro do gênero: *S. bibrainum*, *S. bifidum*, *S. rinoi* e *S. subtile*. O fato deste gênero possuir um pequeno número de espécies decorre das semelhanças taxonômicas, estruturais, fisiológicas e genéticas que elas possuem para com os outros gêneros da mesma família *Selenastraceae*, como *Ankistrodesmus*, *Kirchneriella*, *Monoraphidium* e *Raphidocelis*, acabando por haver dificuldade de classificação<sup>34,35</sup>.

A espécie *S. bibrainum* é considerada a principal representante do gênero, sendo encontrado em quase todos os continentes<sup>36</sup>, sendo a mais estudada, visando o uso biotecnológico e comercial. Ouyang et al. em 2015<sup>37</sup>, identificou que a espécie *S. bibrainum* pode utilizar sal de bicarbonato e dióxido de carbono como fontes de

carbono, obtendo maior produtividade com uma iluminação entre 150 e 170  $\mu\text{mol}$  de fótons/ $\text{m}^2/\text{s}$ . Num estudo realizado no Sri Lanka por Wijeyaratne e Nanayakkara em 2020<sup>38</sup>, observou-se que a *S. bibrainum* era encontrado mais frequentemente em águas que possuíam maiores concentrações de nutrientes e de sólidos dissolvidos. Sasireka e Muthu Velayudham em 2018<sup>39</sup> determinaram que o meio de cultivo Bold Basal Medium (BBM), pH 6,5 e temperatura de 30°C eram as melhores condições de cultivo para *S. bibrainum*. Um estudo feito em 2016 sobre a composição de microalgas encontradas em barragens do rio Fez em Marrocos determinou que a microalga *S. bibrainum* possui cerca de 3,41 a 7,29% de proteínas, 3,83 a 5,45% de carboidratos e 4,79 a 7,73% de lípidos (em relação a seu peso seco)<sup>40</sup>, enquanto que um outro estudo feito por Sasirela e Muthu Velayudham em 2018 na Índia<sup>41</sup>, determinou que uma amostra isolada da mesma microalga tinha 28.2% de conteúdo lipídico; esta discrepância pode ser a consequência das diferenças condições ambientais a que as algas estiveram sujeitas. Quando comparado o cultivo em condições controladas (24 horas de luz, intensidade de 2000 lux e 25°C de temperatura) e em ambiente aberto exposto ao sol (temperaturas variando entre 34°C durante o dia e 27°C durante a noite), a *S. bibrainum* apresentou valores elevados de proteínas (44,7%) e de lipídeos (38,9%), onde o principal fator que determinou esses resultados foi o crescimento da alga utilizando luz solar natural<sup>42</sup>. No que respeita ao teor de carotenoides, Soares et al., em 2019 determinou que a *S. bibrainum*, possuía as seguintes proporções de carotenoides (mg,  $\text{g}^{-1}$ ): 1,73 de luteína, 0,41 de astaxantina, 1,34 de criptoxantina (a maior de todas as algas no estudo), 0,41 de fucoxantina, 0,03 de xantaxantina, 0,16 de  $\beta$ -caroteno e 0,08 de  $\alpha$ -caroteno<sup>43</sup>.

A segunda alga mais comum é a *S. rinoi*, encontrada principalmente na América central e do sul, (Brasil, Cuba e Colômbia)<sup>44-47</sup>, onde alguns estudos consideraram a alga como um bom fertilizante<sup>48</sup> e potencial produtora de carotenoides, com rendimentos em  $\beta$ -caroteno de 3,6mg por grama de biomassa<sup>49</sup>. Três estudos realizados na Alemanha, determinaram a composição da *S. rinoi*, bem como as suas melhores condições de crescimento; Petrick et al. em 2013<sup>50</sup> obteve cerca de 23% de lipídios por biomassa seca, à temperatura de crescimento de 25°C e 1% de  $\text{CO}_2$  (v/v), já Wencker et al. em 2013<sup>51</sup> observou 25% no teor de lipídios e J. Dautz & J. Dinske, fez crescer a microalga em efluentes de aquicultura, atingindo altos teores de proteína (55,6g por 100g de biomassa)<sup>52</sup>.

Em relação às espécies *S. bifidum* e *S. Subtile*, há muita pouca informação devido à sua baixa abundância, sendo que a *S. bifidum* não foi reportada novamente desde Bennet (1887)<sup>53</sup>, e a *S. subtile* é apenas mencionada como presente em certas regiões<sup>36</sup>.

## **2.2. Produção de biomassa**

A quantidade de biomassa produzida determina a quantidade de compostos que foram absorvidos/biotransformados de um efluente, a quantidade de bioenergia que pode ser gerada e em geral os compostos produzidos.

As condições que irão determinar a produção de biomassa são: A espécie ou mix de espécies escolhidas, (levando em consideração o seu metabolismo, composição, velocidade de crescimento entre outros), o meio de cultivo (os nutrientes e compostos a serem usados, fonte e abundância de luz, água, fonte de carbono, mistura, temperatura e pH), o sistema de cultivo (aberto ou fechado) e por fim a manutenção do sistema, mantendo o sistema em condições ideais ou gerando algum tipo de estresse para forçar a produção. Após a produção da biomassa vem as suas formas de extração, tratamentos e preparações finais para o produto escolhido.

O investimento inicial nestas unidades de produção é elevado, estimando-se que sejam necessários cerca de 1,5 milhões de dólares para unidade que produza 36 toneladas de microalgas por ano<sup>54</sup>. Em compensação, anualmente são gerados cerca de 32,6 bilhões de dólares de microalgas secas<sup>55</sup>. Os preços da biomassa para os diferentes sectores são os seguintes: setor energético, 500 dólares por tonelada<sup>56,57</sup>; setor de alimentação humana, 120.000 dólares por tonelada<sup>57,58</sup>, cerca de 15.500 dólares por tonelada no setor relacionado a aquicultura e derivados<sup>57</sup>; e por fim no setor de produção química, o valor de mercado é por volta de 3.500 dólares por tonelada<sup>57</sup>.

## **2.3. Compostos de interesse comercial e sua produção**

Antes de determinar qual a microalga ou sistema de cultivo que será utilizado, é necessário saber qual o objetivo do cultivo, qual o produto final esperado. Como foi mencionado anteriormente, as microalgas possuem diversas possibilidades de produtos e serviços, cada um com as suas vantagens e dificuldades, nomeadamente os custos de produção, o investimento inicial, o escoamento do produto e o valor de venda.

Para tal, um estudo aprofundado, sobre os principais produtos derivados das microalgas deve ser feito preliminarmente a qualquer projeto.

### **2.3.1. Pigmentos**

o interior das microalgas, existem compostos responsáveis diretamente pela atividade fotossintética, que são os pigmentos, sendo divididos em três principais tipos: as clorofilas (compostos solúveis em lípidos, encontrados em quase todos os vegetais e em seus produtos derivados), ficobiliproteínas (pigmentos acessórios, abundantes em microalgas e que auxiliam nos processos fotossintéticos, com propriedades ligadas à

saúde e alimentação<sup>59,60</sup> e por fim, os carotenoides (também solúveis em lipídeos, grandes capacidades antioxidantes e nutracêuticas)<sup>61,30</sup>.

Carotenoides são compostos lipossolúveis, capazes de absorver luz dentro da gama de 400 até 550nm e são as principais responsáveis das cores (variando conforme o número de ligações duplas conjugadas) em vários frutos e vegetais<sup>62</sup>. São definidos como pigmentos provindos de tetraterpenos, onde os terpenos são a maior família de produtos e metabólitos orgânicos naturais<sup>21</sup>.

A principal função dos carotenoides nas microalgas é a de contribuir em fototropismos e fototaxia<sup>63</sup>, nos processos fotossintéticos, além de proteger as células da exposição de altas intensidades de luz<sup>64</sup>. Para além destas funções, existem vários estudos descrevendo outras propriedades dos carotenoides, dependendo do tipo, da microalga e da situação o qual ela se encontra. O  $\beta$ -caroteno participa nos processos de proteção contra radicais livres<sup>21</sup>, a fucoxantina é altamente eficiente na transferência de energia durante o processo de fotossíntese devido à sua estrutura única e também age como fotoproteção e apresenta atividade antioxidante<sup>65,66,67</sup>. A produção destes compostos é potenciada por condições estressantes, utilizando a carotenogenesis para a sua produção<sup>68</sup>.

Em 2016, o mercado global de carotenoides era de 1,24 bilhões de dólares, com projeção de aumentar em mais 0,29 bilhões em 2021<sup>26</sup>, com os principais compostos sendo a astaxantina (ração para peixes, para animais e nutracêutico, totalizando um valor de mercado de 540 milhões de dólares), o betacaroteno (corante natural, nutracêutico, propriedade terapêuticas e rações com valor global de 334 milhões de dólares) e a luteína (corante para cosméticos e comidas e propriedades antioxidantes, valor de mercado de 309 milhões de dólares)<sup>26</sup>.

Dentro dos vários tipos de carotenoides produzidos globalmente pelas microalgas, os mais relevantes são a astaxantina (uma xantofila de cor vermelho rosado e propriedades antioxidantes), o  $\beta$ -caroteno (pigmento laranja com propriedades antiinflamatórias), a luteína (possui cor verde-amarelado com várias propriedades benéficas para o olho humano), fucoxantina (xantofila de cor castanha ou verde-oliva, capaz de atividades antioxidantes em ambientes anóxicos), cantaxantina (uma dicetona de coloração laranja-avermelhado com propriedade neuroprotetoras), licopeno (possuindo cor vermelha com capacidade de reduzir doenças e problemas relacionados com o coração) e a violaxantina (uma xantofila laranja, usado como aditivo para alimentos)<sup>28,69</sup>.

Dentre as técnicas e procedimentos para a produção de carotenoides, podemos citar<sup>27</sup>:

- Uso de espécies que metabolizam carotenoides em maiores quantidades;

- O uso de biorreatores que permitem um amplo controle de propriedades físico-químicas do cultivo;
- Alteração entre regimes de heterotrofia e autotrofia;
- Utilização de suplementos;
- Uso de diferentes cores de luz<sup>71</sup>;
- Estresse luminoso<sup>70, 71</sup>;
- Estresse osmótico (alta salinidade) <sup>70, 71</sup>;
- Estresse de nutrientes (normalmente azoto e/ou fósforo) <sup>70, 71</sup>;
- Altas temperaturas<sup>70, 71</sup>;
- Estresse por adição de ferro<sup>70</sup>.

Estas técnicas proporcionam um aumento no teor de carotenoides devido a alteração nas vias metabólicas das microalgas, induzindo a produção de compostos que irão combater os danos causados por estresse e auxiliar a microalga a se adaptar a um novo ambiente<sup>70,71</sup>. No caso do uso de suplementos (como auxinas), eles ajustam as vias bioquímicas internas da microalga, servindo como agentes promotores de crescimento<sup>70,71</sup>.

### **2.3.2. Proteínas**

As proteínas são biopolímeros constituídos por sequências de aminoácidos, que são essenciais para os vários organismos; muitas vezes não são produzidas por eles próprios, sendo então necessário fornecê-las, proporcionando benefícios nutricionais e de saúde<sup>72</sup>.

Dentro das microalgas, as proteínas participam na organização estrutural e metabolismo, sendo essenciais no complexo de coleta de luz e como enzimas catalíticas presentes na fotossíntese<sup>73,74</sup>. A demanda global de proteínas ronda os 202 milhões de toneladas por ano, com projeções de alcançar entre 350 e 1250 milhões de toneladas em 2050<sup>75,76</sup>. As microalgas podem contribuir para satisfazer esta necessidade, já que podem alcançar por volta de 50% de conteúdo proteico por biomassa seca<sup>77</sup>, maior que outras fontes populares de proteínas, como soja com 37%, leite com 26%, carne com 43% e leveduras com 39%<sup>78</sup>. Para além da velocidade de produção, a qualidade da proteína das microalgas e as baixas reações alérgicas, ampliam o interesse por proteínas de algas<sup>79</sup>. O valor de mercado para 1 tonelada de proteínas provenientes de microalgas seria de 5000 dólares<sup>80</sup>.

Os métodos de produção, em geral, não requerem requisitos específicos e estão concentrados nas condições para obtenção da maior quantidade de biomassa possível. Porém, tendo em conta a aplicação, a qualidade e quantidade dos nutrientes tem de ser assegurada, nomeadamente o azoto, já que influencia o metabolismo de produção

proteica<sup>81</sup>. Outros compostos que influenciam a produção de proteínas são alguns metais como o Mn, Ni, Fe, Cu e Zn<sup>82</sup>; em algumas algas o estresse gerado por NaCl pode aumentar a produção de proteínas<sup>83</sup>. Com base nas proteínas das algas, é possível gerar produtos com diferente conteúdo proteico e grau de refinamento, desde: célula inteira (entre 40 e 50% de conteúdo proteico), concentrados de proteínas (60 e 89% de proteínas), isolados (90 e 95%), hidrolisados (75 e 95%) e peptídeos bioativos (>95%), cada um necessitando de maiores gastos e estágios de separação e purificação<sup>84</sup>.

### **2.3.3. Lipídeos**

Os lipídeos são substâncias de origem biológica, solúveis em solventes não polares, normalmente hidrocarbonetos, sendo divididos em dois grupos: os lipídeos saponificáveis (glicéridos como as gorduras e óleos e os fosfolipídeos) e os lipídeos não saponificáveis (esteroides)<sup>85</sup>. As gorduras (constituídas por lipídeos neutros e polares) podem dividir-se em dois tipos, as saturadas (sem duplas ligações) e as insaturadas (pelo menos uma ligação dupla) e são elas que irão determinar a qualidade e características dos lipídios presentes nas microalgas que poderão posteriormente serem usados para formar diferentes produtos<sup>86</sup>.

Dentro das microalgas, os lípidos podem ter funções estruturais (normalmente lipídeos polares com longas cadeias de ácidos gordos como o glicerofosfolipídeos) e de armazenamento de energia, como os triacilglicerídeos<sup>87</sup>. Os lipídeos estruturais podem ser transformados para serem obtidos ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs), nos quais se incluem o ácido eicosapentaenóico, docosapentaenóico e ácido docosahexaenico, sendo estes responsáveis por formar supercomplexos mitocondriais<sup>88</sup>. Estes lipídeos polares (e alguns esteróis) permitem a separação e proteção das organelas em relação ao exterior da célula<sup>89</sup>, além de manter a fluidez da membrana, situações de fusão de membranas, processos metabólicos, sinalização celular e responder a mudanças no ambiente celular<sup>89,90</sup>. Os lipídeos não polares, como o triacilglicerol, responsabilizam-se pelo armazenamento de energia, indiretamente performam atividades na reorganização da membrana em situações de mudanças súbitas no ambiente, produzindo lipídeos polares<sup>91,92</sup>.

No mercado, o valor dos lipídeos varia muito conforme a sua utilização; para biocombustíveis valem cerca de 200 dólares por tonelada, para produtos químicos cerca de 330 dólares por tonelada, enquanto que para usos humanos podem alcançar 1160 dólares por tonelada para aditivos alimentares, 1000 dólares por tonelada para cosméticos e saúde e por fim o uso completo dos lipídios pode chegar até 1400 dólares por tonelada<sup>93</sup>. A figura 4 apresenta os diferentes tipos de lípidos, bem como algumas das suas aplicações.

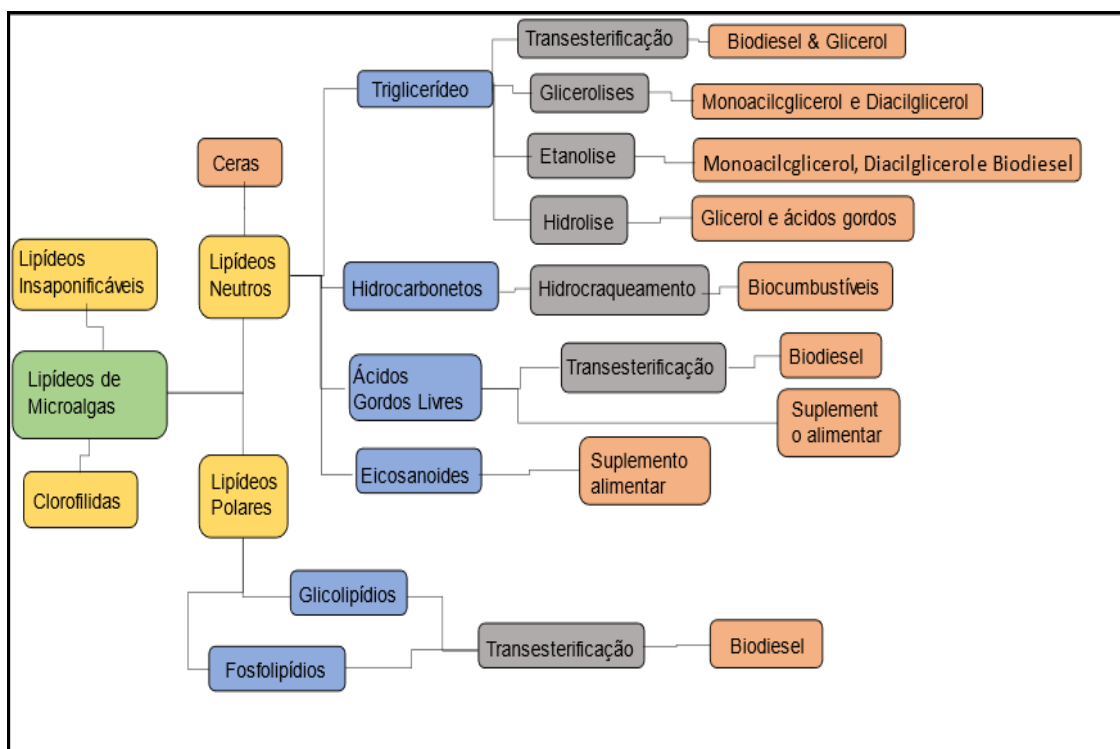


Figura 4 – Diferentes aplicações para lipídeos provenientes de biomassa de microalgas (modificado de Ferreira et al., e suas respectivas referências<sup>94</sup>).

Variando a forma, condições de cultivo e as espécies de microalgas cultivadas, o conteúdo lipídico pode variar entre extremos de 1% até 70% em relação a biomassa seca (peso/peso)<sup>77,95</sup>. Comparado com outros vegetais, as microalgas são as maiores produtoras de conteúdo lipídico por hectare, 58700 L/ha em comparação com os 5950 L/ha do óleo de palma ou 2689 L/ha do coco<sup>29,96</sup>. Os fatores que podem determinar o conteúdo lipídico nas microalgas são: a fase de crescimento, disponibilidade de nutrientes (como azoto<sup>97</sup>, fósforo<sup>98</sup> e ferro<sup>99</sup>), salinidade, intensidade de luz, temperatura (baixas temperaturas como 13-20°C diminuem teor de lipídeos e altas como 25-35°C aumentam)<sup>100-102</sup> e pH (estresse alcalino)<sup>103-105</sup>. Apesar de estar comprovado que as microalgas têm potencial para a produção de biocombustíveis, a viabilidade industrial da exploração carece de confirmação<sup>106</sup>. De facto, para conferir viabilidade ao processo é essencial implementar o conceito de biorrefinaria, maximizando a recuperação dos diversos componentes, incluindo os maiores valores acrescentados, tais como os relacionados com a saúde e alimentação humana. Ácidos gordos poli-insaturados (PUFA), tais como o EPA (eicosanoico) e o DHA (docosahexanoico) (tipo de ácidos ômega 3), ajudam a diminuir o colesterol no sangue, são anti-inflamatórios e evitam doenças coronárias<sup>107,108</sup>. O PUFA ômega-6 (mais especificamente o ácido araquidônico) é considerado o precursor de moléculas como as



leucotrienos e prostaglandinas, as quais promovem o bom funcionamento do cérebro e do sistema circulatório<sup>107,109</sup>. O ácido linoleico (GLA) apresenta benefícios no tratamento da artrite, obesidade, doenças do coração, depressão, alcoolismo, doença de Parkinson, esquizofrenia, deficiência em zinco e etc<sup>110</sup>.

#### **2.3.4. Outros compostos e produtos**

Apesar dos mais relevantes aproveitamentos das microalgas estar em volta dos seus benefícios nutricionais, de saúde e como fonte de bioenergias, existem ainda muitas outras formas de se aproveitar os seus compostos.

Certos metabolitos das microalgas podem causar efeitos alelopáticos (afetam crescimento, sobrevivência e/ou reprodução de outros organismos), servindo como bactericida, herbicida, fungicida, inibidor ou indutor de crescimento em plantas e em certos casos como pesticida<sup>111,112</sup>.

Compostos como o glicerol possui inúmeras aplicações em diferentes indústrias, desde os cosméticos até ao sector automóvel<sup>113</sup>, compostos isotópicos estáveis para ajudar em investigações sobre processos metabólicos, diagnóstico de doenças e entre outras aplicações<sup>114</sup>.

Por fim, a biomassa de microalgas pode também ser utilizada para a produção de biopolímeros como nano-celulose, na produção de bioplásticos, seja como plásticos híbridos, bio-polietileno, plásticos baseados em celulose, entre outros<sup>30</sup>.

### **2.4. Consórcio de bactérias e microalgas**

A utilização conjunta de microalgas e bactérias pode trazer sinergias muito importantes<sup>115</sup>. Esta sinergia pode ocorrer com culturas suspensas ou com culturas fixas, o que afeta as interações entre as algas e as bactérias.

Um fator que deve ser ressaltado em relação ao consórcio de bactérias e microalgas, é que para realizar este tipo de cultivo, é interessante dispor de uma grande quantidade e diversidade de nutrientes, para nutrir os diferentes microrganismos. A melhor fonte de nutrientes para tal tipo de cultivo seriam efluentes industriais e domésticos.

A presença de inúmeros nutrientes em diferentes formas químicas, nomeadamente para o azoto e o fósforo, pode influenciar a sinergia entre as bactérias e as algas<sup>116,117</sup>. As principais interações que irão ocorrer, serão as bactérias a oxidar os compostos mais complexos disponíveis, gerando CO<sub>2</sub>, e as microalgas a assimilar os nutrientes simples e CO<sub>2</sub>, libertando em contrapartida o O<sub>2</sub> para as bactérias<sup>118,119</sup>. Outros ciclos essenciais são o ciclo do azoto e a transformação da amónia e seus compostos subsequentes<sup>120</sup>.

A aplicação de um consórcio de microalgas e bactérias pode ser mais uma das várias soluções para aumentar a produção de biomassa algal e realizar economias de custos, nomeadamente através da utilização de efluentes como fonte de nutrientes e realizando assim o seu tratamento. Contudo, esta solução exige um maior controlo para manter todas as interações interessantes de forma ativa; além da manutenção do pH, temperatura, iluminação e mistura que continuam essenciais e vão diretamente influenciar todos os procedimentos, o consórcio acaba adicionando mais fatores para um sistema que já é complexo. Apesar da complexidade, o bom uso e gestão de um consórcio tem a capacidade de criar um sistema que se autorregula, sendo necessário apenas controlar a intensidade de luz e a entrada de nutrientes<sup>121-123</sup>. A tabela 1 resume algumas das interações no consórcio.

Tipo de nutriente	Possíveis interações entre um consórcio de microalgas e bactérias	Parâmetros que afetam a interação entre o consórcio de microalgas e bactérias
N-NH <sub>4</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suprimento de O<sub>2</sub> para as bactérias – reduz os requisitos de aeração</li> <li>• Bactérias excretam substâncias que promovem crescimento em plantas</li> <li>• Interações entre microalgas e bactérias levam a uma maior extensão da nitrificação assim como maiores possibilidades de nitrificação completa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Alta = interação sinérgica Baixa = interação competitiva (negativamente)</li> <li>• Proporções de C/N: Altas = Interações inefetivas Baixas = Interações positivas</li> <li>• Razões de inóculo de algas / bactérias nitrificantes Alta = Maior remoção de amônia</li> <li>• Intensidade de luz: Baixas = Interação sinérgica entre microalgas bactérias / grande remoção de amônia</li> </ul>
N-NO <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fornecimento de H<sub>2</sub> para desnitrificadores hidrogenotróficos por algas durante condições de pouca luz (anaeróbia)</li> <li>• Interações negativas entre microalgas e bactérias durante períodos de luz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclo Claro-Escuro</li> <li>• Gerenciamento de densidade de cultura</li> <li>• Razões de inóculo de algas para desnitrificantes</li> </ul>
P-PO <sub>4</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fornecimento de cofator de vitaminas por bactérias para o crescimento de microalgas e absorção de fosfato</li> <li>• Suprimento de O<sub>2</sub> pela microalgas para comunidades de organismos que acumulam polifosfato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentração de N-nitrato</li> <li>• Ciclo Claro-Escuro</li> </ul>

Tabela 1 – Resumo das principais interações entre microalgas e bactérias na remoção de nutrientes (modificado de Fallahi et al., e suas respectivas referências<sup>121</sup>).

## 2.5. Condições de estresse

Quando os organismos ficam fora do seu habitat natural e passam a sofrer impactos por fatores externos, alteram os seus metabolismos, para tentar compensar e sobreviver a estas condições de estresse, sejam eles provenientes de outros seres vivos, do ambiente, ocorrendo naturalmente ou artificialmente. A figura 5 exemplifica alguns fatores abióticos responsáveis por condições de estresse. As microalgas são seres unicelulares capazes de se adaptarem facilmente a diversas condições e a resposta que dão para lidar com o estresse leva muitas vezes ao aumento da produção de diversos metabólitos

interessantes, como pigmentos, lípidos, proteínas, carboidratos, biopolímeros e muitos outros<sup>124</sup>.

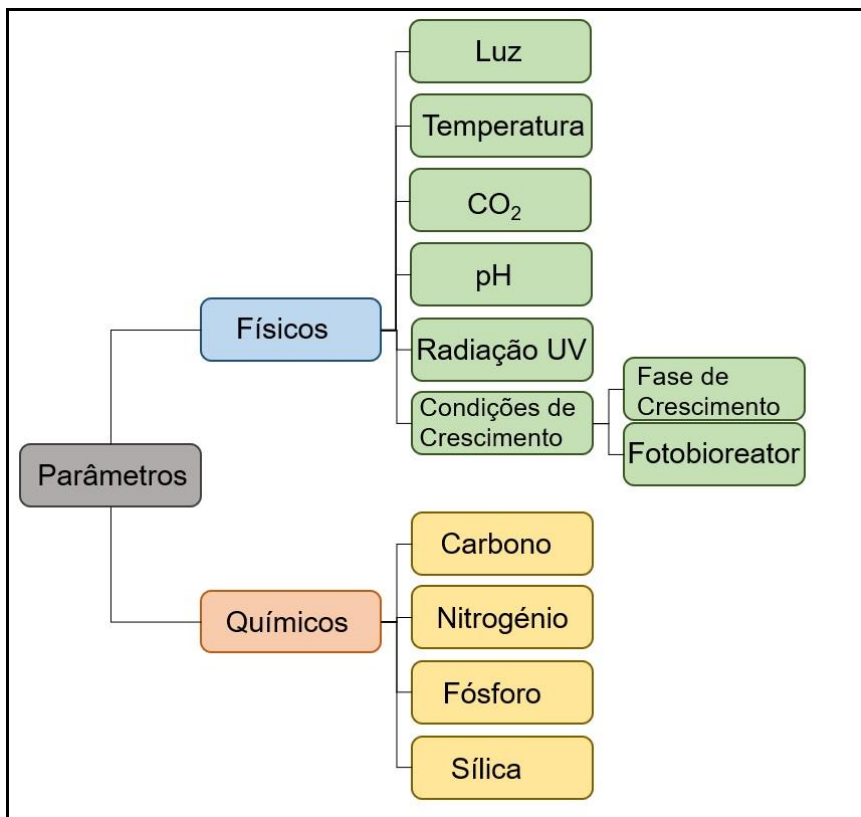


Figura 5 – Parâmetros abióticos envolvidos na produção de biomassa de microalgas (modificado de Ananthia et al.<sup>125</sup>, e suas respectivas referências).

Um problema que ocorre ao utilizar estresse artificial sobre uma cultura de microalgas é que elas irão cessar a sua divisão celular, ou seja, os metabolitos serão produzidos em detrimento de mais biomassa. Assim, a produção fica restringida ao número de células previamente existentes, limitando a capacidade máxima teórica do cultivo. Certas estratégias já foram propostas e testadas para resolver esta questão, nomeadamente a manipulação genética das microalgas, mas a considerada mais simples e prática, é o cultivo em dois estágios. Neste caso, as microalgas são cultivadas, primeiramente, em condições ideais para crescerem e acumular o máximo de biomassa possível na área de cultivo disponível, e quando esse máximo é atingido, as condições de cultura são alteradas para gerar o processo de estresse desejado gerando assim a acumulação de compostos no segundo estágio<sup>126</sup>.

Um dos possíveis procedimentos para induzir estresse envolve os mesmos parâmetros que são levados em consideração ao preparar o meio de cultura, apenas modificados para valores suficientemente extremos para causar um efeito nas algas, sem causar morte celular. Limitação de um ou vários nutrientes<sup>126</sup>, alteração da intensidade de luz

e alteração da temperatura<sup>124</sup>. Outras formas de induzir estresse é adicionar fatores externos ao meio de cultura, como compostos que gerem danos oxidativos<sup>127</sup>, competição ou influencia de outros organismos, adição de compostos que alterem a dinâmica química do meio, entre outros<sup>124,126,127</sup>.

## 2.6. Tratamentos de efluentes

O elevado consumo de água, ao nível doméstico, industrial e agricultura, entre outros, e a necessidade de tratar efluentes e águas contaminadas, gera a necessidade de buscar meios ecológicos, práticos e econômicos alternativos aos atualmente existentes. Uma das soluções é a utilização de microalgas para tratar esses efluentes<sup>128,129</sup>. Os poluentes mais representativos são os seguintes: poluentes orgânicos (tinturas, nutrientes, fármacos, hidrocarbonetos, herbicidas, pesticidas, etc), poluentes inorgânicos (principalmente metais pesados, haletos, oxianíons, catiões, ácidos, etc) e poluentes biológicos (nematoides, fungos, bactérias, vírus e outros transmissores de patógenos)<sup>130</sup>.

Os métodos convencionais de tratamento de efluentes incluem as seguintes etapas: Tratamento preliminar (removem sólidos grosseiros); tratamento primário, onde são parcialmente removidos os sólidos suspensos e alguma matéria orgânica; tratamento secundário, onde os compostos orgânicos e inorgânicos solúveis e coloidais são biotransformados pelas bactérias; tratamento terciário ou avançado, onde são removidos nutrientes residuais e microrganismos<sup>131</sup>. Este sistema de tratamento pode ser exemplificado na figura 6 a seguir.

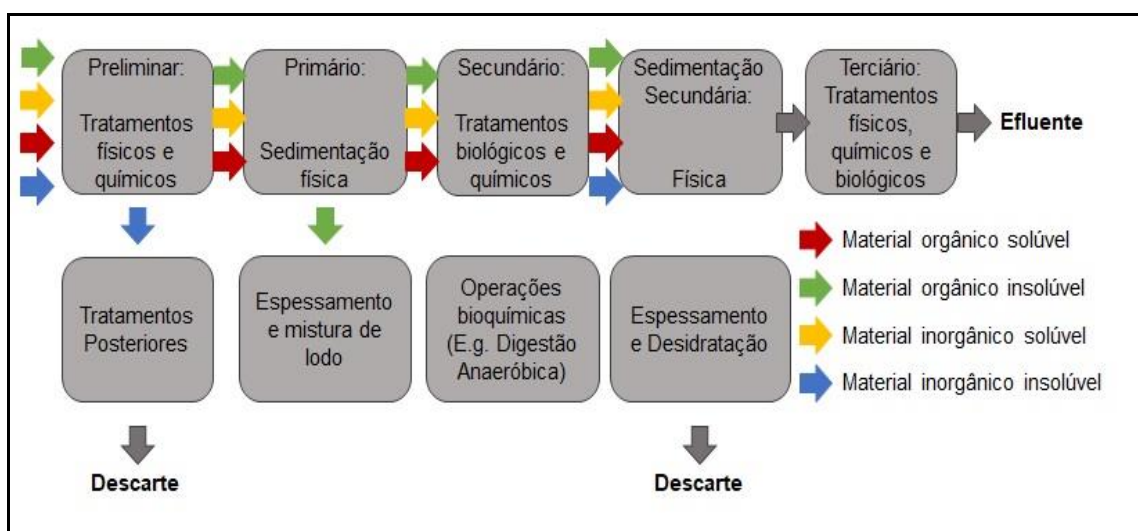


Figura 6 – Diagrama esquemático para sistemas convencionais para tratamento de efluentes (modificado de Mohsenpour et al.<sup>132</sup>, e suas respectivas referências).

Dentro destas etapas, existem vários processos que podem ser utilizados, resumidos em operações físicas (triagem, fragmentação, equalização de fluxo, sedimentação, flotação, filtração de meio granular), químicas (precipitação química, adsorção, desinfecção, desclorinização) e biológicas (processo de lodo ativado, lagoa aerada, filtros de gotejamento, lagoas de estabilização, digestão anaeróbica)<sup>133,134</sup>. Um resumo das formas de operação e suas respectivas técnicas podem ser observadas na figura 7.

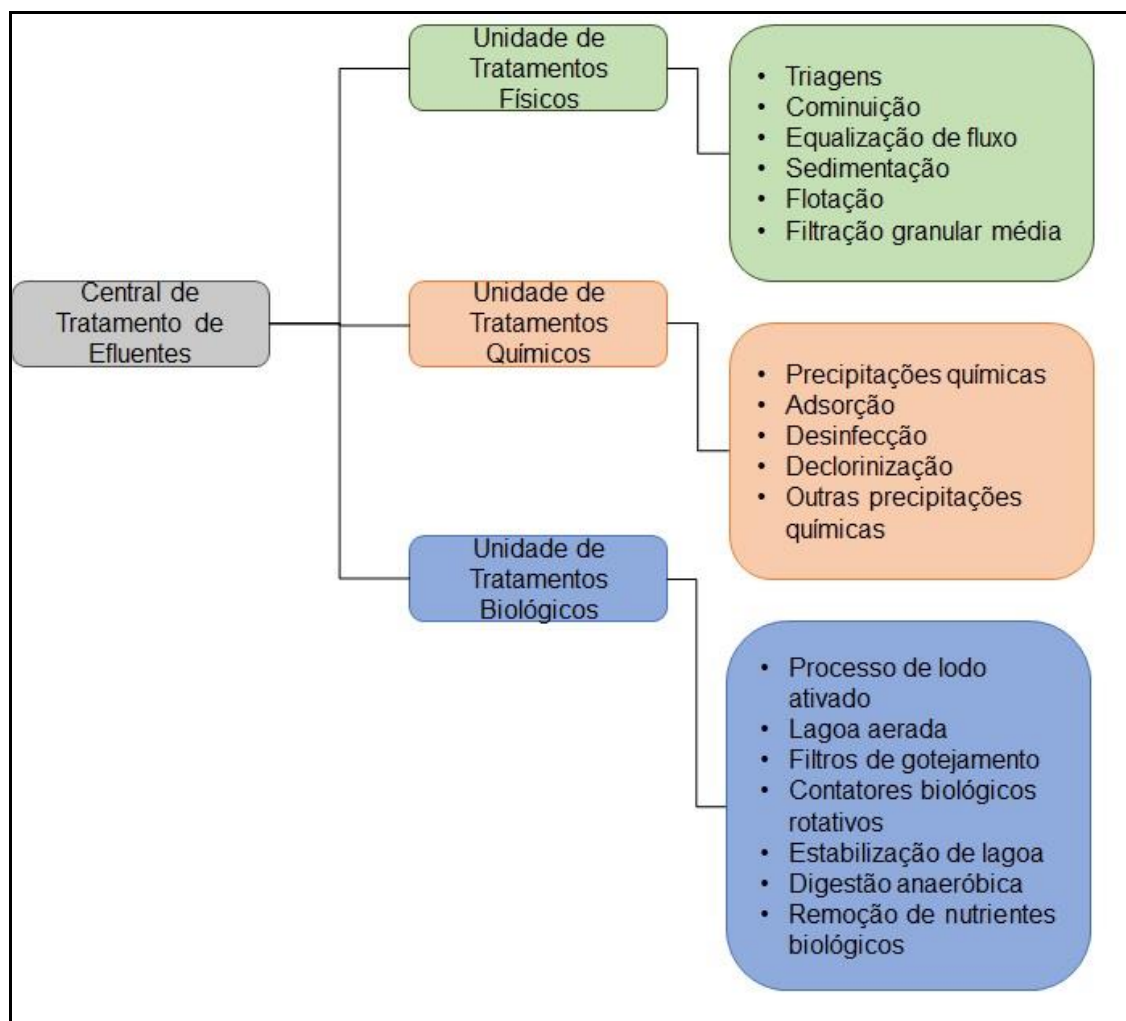


Figura 7 – Processos de tratamento de efluentes (modificado de Rawat et al.<sup>135</sup>, e suas respectivas referências).

Apesar dos métodos acima citados serem efetivos, caracterizam-se por constituírem custos muito significativos sem retorno, para além do ambiental. Ao contrário, o uso de microalgas, incluindo o consórcio com bactérias, tem a capacidade de tratar os efluentes com similar eficácia, menores custos e ainda gerar produtos de interesse comercial<sup>136,137</sup>. As microalgas teriam que ser utilizadas no processo secundário ou terciário, dependendo do tipo de efluente, teria que ser levado em consideração a

quantidade de nutrientes e de outros parâmetros que garantam o mínimo para a sobrevivência e crescimento das microalgas. Devido às regras de segurança alimentar, a biomassa produzida com efluentes industriais e/ou domésticos teria que ser limitada a usos que não envolvam consumo humano ou animal, pelo menos até se desenvolverem métodos de purificação apropriados. Considerando que o maior uso da biomassa será para a produção de bioenergia<sup>138</sup>, o método mais efetivo de cultivo de microalgas em efluentes seria o de lagoas abertas, onde é necessário um menor controle, logo menores custos, selecionando as espécies de microalgas capazes de suportar tais condições<sup>139</sup>.

## **2.7. Condições de cultura**

Os fatores determinantes do crescimento das microalgas são os seguintes: luminosidade, nutrientes, incluindo o azoto e o fósforo, fonte de carbono, pH, temperatura, agitação. Estes parâmetros irão afetar o crescimento do cultivo, bem como a composição da biomassa, pelo que a condição de cultura tem de ser analisada em conjunto com a escolha da espécie de microalga e o sistema de cultivo. É importante lembrar que a variação destes parâmetros pode ocasionar estresses sob o cultivo que podem beneficiar a biomassa, nomeadamente enriquecendo-a com compostos de alto valor, sacrificando a sua capacidade de multiplicação. Todas estas condições tem que ser analisadas e balanceadas para se chegar às condições finais de cultura, e para tal, é necessário conhecer os efeitos de cada parâmetro sobre as microalgas.

### **2.7.1. Luminosidade**

A intensidade luminosa é o elemento essencial para a atividade fotossintética das algas, que permite a transformação de água e CO<sub>2</sub> em metabolitos e energia química<sup>140</sup>. O tempo de exposição, o tipo e a quantidade de luz que é proporcionada, irão ditar a composição bioquímica das algas e a sua capacidade de replicação, onde normalmente, quanto maior a intensidade e o tempo de exposição, maior será a produção fotossintética. Contudo, há um limite até onde as microalgas podem aproveitar esta intensidade, pois é necessária uma fase escura para a produção de outros metabolitos<sup>141-143</sup>. A maioria dos estudos conclui que 16 horas de luz e 8 horas de escuro é o mais apropriado para a maioria das espécies<sup>144</sup>. Quanto a intensidades, dependendo da espécie e de outras condições de cultivos, o limite de saturação luminosa (ponto máximo em que a intensidade luminosa afeta aumentado a fotossíntese) pode variar entre os 300 e 1600 de fotões/m<sup>2</sup>/s<sup>-1</sup><sup>145</sup>.

### **2.7.2. Temperatura**

A temperatura a que as microalgas estão expostas, regula o metabolismo e sínteses de compostos no interior da célula; temperaturas baixas podem afetar o funcionamento de processos enzimáticos e reduzir a assimilação de carbono, enquanto temperaturas demasiado elevadas irão interromper o balanço de energia dentro da célula, diminuindo a taxa fotossintética<sup>146</sup>. A temperatura também afeta a solubilidade do CO<sub>2</sub> e o valor de pH do meio, entre outros parâmetros físicos<sup>147,148</sup>. Apesar de cada espécie de microalga ter a sua temperatura ideal, é considerado que por volta dos 25°C a grande maioria das microalgas poderem crescer de forma saudável<sup>149</sup>.

### **2.7.3. Carbono**

O Carbono é um elemento essencial para a vida, tal como a conhecemos. No caso das microalgas, cerca de 50% da sua biomassa seca é carbono, assimilado de fontes externas, tais como o CO<sub>2</sub> atmosférico ou outras fontes orgânicas ou inorgânicas<sup>150</sup>. As possíveis fontes de carbono variam com a espécie de microalga, mas a maioria consegue obter carbono através do CO<sub>2</sub> absorvido no meio, bicarbonato de sódio (ou outros bicarbonatos), glucose, amido, acetato, glicerol e sucrose<sup>143,151</sup>. O carbono tem uma grande participação nos processos metabólicos das microalgas, entrando na fotossíntese, na produção de enzimas, pigmentos, entre outros<sup>152,153</sup>. Dentro de certos limites, as microalgas beneficiam com altas concentrações de carbono, mas um excesso de CO<sub>2</sub> pode acidificar o meio e diminuir o crescimento da biomassa. Por outro lado, altas concentrações de carbono orgânico podem potenciar a contaminação do meio por outras espécies<sup>140</sup>.

### **2.7.4. Azoto e fósforo**

Apesar de cada espécie necessitar de quantidades diferentes de azoto e fósforo, dependendo do seu processo metabólico, ambos os nutrientes (nas suas diferentes formas) são essenciais em qualquer cultivo de microalgas. Na biomassa, o teor de azoto pode variar entre 1 ou mais de 10%<sup>154</sup>, ou seja, um baixo teor de azoto no meio irá reduzir o crescimento das microalgas<sup>127</sup>. Dentre as formas em que o azoto pode ser absorvido e utilizado pelas microalgas, tem-se o nitrato de potássio, sulfato de amônio, peptona, nitrato de amônia, amônia, nitrato e ureia (sendo estes 3 últimos os mais utilizados)<sup>155</sup>. O fósforo determina a quantidade e composição de metabolitos dentro da célula (como lipídeos e carboidratos); concentrações extremas de fósforo são amplamente usadas e estudadas para a obtenção de altas produtividades<sup>156</sup>. O fosfato, particularmente na forma de hidrogeno fosfato dipotássico, é a forma mais escolhida e consumida pelas algas<sup>143,157</sup>.

### **2.7.5. Outros nutrientes**

Para além dos macronutrientes (carbono, azoto e fósforo), existem muitos outros elementos e compostos que apesar de estarem em menores quantidades, influenciam bastante o metabolismo celular e o crescimento da biomassa. Alguns dos mais relevantes são os iões metálicos (como magnésio e ferro) e vitaminas (B1, B7 e B12). As vitaminas podem proporcionar um rápido crescimento, acelerando o processo fotossintético<sup>158</sup>. Por outro lado, o ferro tem uma participação essencial na síntese da clorofila<sup>159</sup>, no transporte de elétrões no processo fotossintético<sup>160</sup>, respiração e fixação de azoto<sup>161-163</sup>, o magnésio pode, em certos casos, ser uma alternativa ou suplemento ao ferro<sup>164</sup>.

### **2.7.6. pH**

A determinação de um pH ideal para cada espécie é uma tarefa complexa, devido à complexidade das interações que ocorrem no meio de cultura e dentro da célula. O pH interfere na capacidade fotossintética, na solubilidade do CO<sub>2</sub><sup>165</sup>, no controlo de contaminações no meio<sup>166</sup>, na assimilação do CO<sub>2</sub><sup>167</sup>, na permeabilidade da membrana celular, atividade enzimática e síntese de óleos<sup>125</sup>. No entanto, e para a maioria das espécies, o pH do meio de cultivo deverá estar na gama 6 a 8<sup>140,168</sup>.

### **2.7.7. Agitação**

Para definir a intensidade e tipo de agitação, é necessário considerar o peso, o tamanho, a densidade das células e a sua tolerância a tensão de cisalhamento<sup>140</sup>. Uma agitação adequada do meio irá garantir uma boa distribuição de microalgas, auxilia na solubilidade de gases<sup>169</sup>, evita gradientes de temperatura, luz, pH e nutrientes, evita a sedimentação<sup>170</sup> e outros compostos<sup>140,170</sup>.

## **2.8. Tipos de biorreatores**

As microalgas são encontradas naturalmente em todo o globo, principalmente em locais com água, como lagos, rios e oceanos, podendo em alguma ocasião dominar totalmente o ambiente e modificá-lo para satisfazer as suas necessidades biológicas. Apesar desta grande capacidade de adaptação e dominância em certos ambientes, a exploração industrial direta das microalgas proveniente da natureza é muito baixa; pelo contrário, a exploração direta das macroalgas tem relevância industrial<sup>171,172</sup>.



Para além das características intrínsecas da microalga em apreço, as condições de cultivo determinam o tipo de controlo possível, os custos e capacidade de produção. Os sistemas de cultivo podem dividir-se genericamente em reatores abertos e fechados, cada um com as suas vantagens e desvantagens, principalmente no que diz respeito aos custos, área disponível e controlo do processo. A tabela 2 resume a comparação entre os dois sistemas.

Parâmetros	Sistemas Abertos	Sistemas Fechados
Contaminação	Alta	Baixa
Evaporação de água	Alta	Baixa
Utilização de luz	Baixa	Alta
Qualidade de produção	Baixa	Alta
Período de crescimento	6 a 8 semanas	2 a 4 semanas
Controlabilidade (temperatura, intensidade luminosa, taxa de mistura)	Baixa	Alta
Flexibilidade de produção	Apenas algumas poucas espécies são possíveis	Mudanças são possíveis visto que os parâmetros de crescimento são controláveis
Tensão de cisalhamento	Baixo devido a mixagens suaves	Altas devido a fluxos turbulentos e bombeando através da troca gasosa
Custos de operação	Relativamente barato	Custoso
Custos de colheita	Alto, dependendo das espécies	Baixo devido a alta concentração de biomassa
Custos capitais	Moderada	Alta

Tabela 2 – Comparação entre sistemas abertos e fechados para cultivo de microalgas (modificado de Yina et al.<sup>173</sup>, e suas respectivas referências).

Para além do que ficou dito, a escolha do reator terá de ter em conta a espécie, o tipo de água usada (doce, salgada ou efluente) e a principal fonte de nutrientes.

### 2.8.1. Fotobiorreatores fechados

Os fotobiorreatores fechados apresentam a grande vantagem de se poder controlar as condições do cultivo, eliminar diversas influências externas como a contaminação por outros organismos e a necessidade de grandes áreas (quando construído verticalmente) para construção dos sistemas, além de possuir uma relação de produção por área mais elevada. Contudo, para obter todas estas vantagens, significa utilizar muitos recursos para a aplicação e manutenção do sistema, obrigando que o cultivo seja altamente eficiente e que os produtos gerados tenham alto valor agregado, para o sistema ter viabilidade económica. Não de estranhar, portanto, que sejam preferencialmente

usados para a produção de compostos para a área de farmacologia, cosméticos e alimentos<sup>174,175</sup>.

Dentro dos fotobiorreatores fechados, temos os tubulares, flat-panel, em colunas, tanque de mistura, tubo de aeração (airlift), em sacos e biofilmes, entre outros. Os reatores são feitos de materiais transparentes como polipropileno, policarbonatos, vidro e acrílico. Os flat-plate, são considerados os mais eficientes entre os biorreatores fechados<sup>19</sup>, por proporcionarem uma maior área efetiva de iluminação, o seu design evita a acumulação de oxigênio dissolvido e capacidade de ser aplicado em sistemas modulares de fácil instalação e scale-up<sup>176,177</sup>. Em relação aos reatores tubulares, eles podem ser instalados na vertical ou na horizontal, costuma ocorrer um maior acúmulo de oxigênio dissolvido e devido a isso, uma menor eficiência fotossintética, chances de crescimento de microrganismos invasores na superfície interna do tubo, além de ter uma demanda energética maior que a de outros biorreatores<sup>178</sup>. Os de colunas podem ser de dois tipos: de coluna simples e de airlifit. Nestes últimos, há duas zonas de diferentes densidades aparentes, que induzem a circulação, o que permite um ótimo aproveitamento de CO<sub>2</sub>, boa eficiência fotossintética, excelentes transferências de massa e mistura junto com a vantagem de dificilmente microrganismos crescerem nas partes internas do reator, além de um custo menor de operação<sup>175,178</sup>.

### **2.8.2. Open pond ou raceways (lagoas abertas / lagoas de pista)**

Considerados os mais econômicos e versáteis dos sistemas, podendo aproveitar os efluentes municipais ou de indústrias como fonte de nutrientes, os sistemas abertos se assemelham com o estado natural em que as microalgas são encontradas, o quer dizer que as dificuldades de um sistema natural estão incluídas neste método de cultivo (como contaminação por microrganismos predadores ou competidores, evaporação, baixo ou nenhum controle sobre a temperatura, pH, iluminação etc). Dentre os principais tipos de sistemas abertos tem-se o raceway, lagoas sem mistura e lagoas circulares com mistura<sup>179</sup>. Considerada a mais antiga, os lagos sem mistura são simplesmente corpos d'água parados, muitas vezes aproveitando lagoas naturais, é o sistema que menos depende de manutenção, mas todos os efeitos externos irão determinar o crescimento das microalgas, e como não há mistura, há uma menor concentração de CO<sub>2</sub> dissolvido, má distribuição de nutrientes e entre outros fatores. Neste caso é aconselhado microalgas altamente robustas e competitivas e que tenham capacidade de locomoção própria como por exemplo a *Dunaliella salina*<sup>179</sup>. Não muito diferente da anterior, as lagoas circulares com mistura possuem muitas características semelhantes, contudo, costumam ser lagos artificiais, de baixa profundidade (cerca de

25cm) e com um braço mecânico promovendo a mistura do sistema, e apesar de ter um alto risco de contaminação e pouco controle na incidência de luz e temperatura. O fato de poder haver uma mistura homogênea garante um maior desenvolvimento da biomassa e aproveitamento de toda a área do reator<sup>179</sup>. Por fim, os sistemas de raceway, são os mais eficientes de todos os sistemas abertos, possuindo uma boa relação de produção por área, decorrente da boa mistura de nutrientes, biomassa e CO<sub>2</sub> dissolvido graças ao sistema de pás que garante uma mistura homogênea no sistema<sup>32,179</sup>. Apesar de algumas desvantagens destes sistemas, existem propostas para as amenizar, tais como aplicar uma cobertura<sup>175</sup>, consórcio de microrganismos probiótico ou compostos químicos para evitar contaminações<sup>180</sup>.

### **2.8.3. Outros tipos de sistemas**

Para além dos sistemas de cultivo mencionados, outros métodos similares ou adaptações podem ser usadas para tentar combater algumas das limitações dos sistemas de cultivos, ou então para potencializar as vantagens de determinadas espécies ou formas de cultivo. Um destes sistemas consiste no cultivo em sistemas costeiros, utilizando membranas ultrafinas para reter as microalgas, deixando passar a água do mar e os nutrientes<sup>181</sup>. Um outro sistema é o fermentador, onde o sistema pensado para o cultivo de bactérias é adaptado para o cultivo heterotrófico de microalgas, onde estas utilizam carbono orgânico no lugar de CO<sub>2</sub><sup>179,182</sup>.

## **2.9. Processamento da biomassa**

Após as etapas de produção de biomassa, incluindo a otimização da produtividade e dos compostos de interesse, é necessário iniciar os procedimentos de recuperação desses produtos do meio de cultivo. Para este efeito, muitas vezes é necessário que a biomassa passe por uma etapa de pré-tratamento, que normalmente envolve na quebra da parede celular, de outras membranas, de ligações químicas ou conversão de bioprodutos<sup>125</sup>. É essencial determinar o tratamento ideal para cada situação, pois este pode alterar estruturas químicas dos produtos que querem ser recuperados ou então subprodutos que também poderiam ser aproveitados. Os tratamentos podem ser divididos em físico, químico e biológico, embora seja possível combinações de diferentes tratamentos para uma maior extração de compostos. Uma simples exemplificação da parede celular de uma microalga e seus compostos está ilustrado na figura 8.

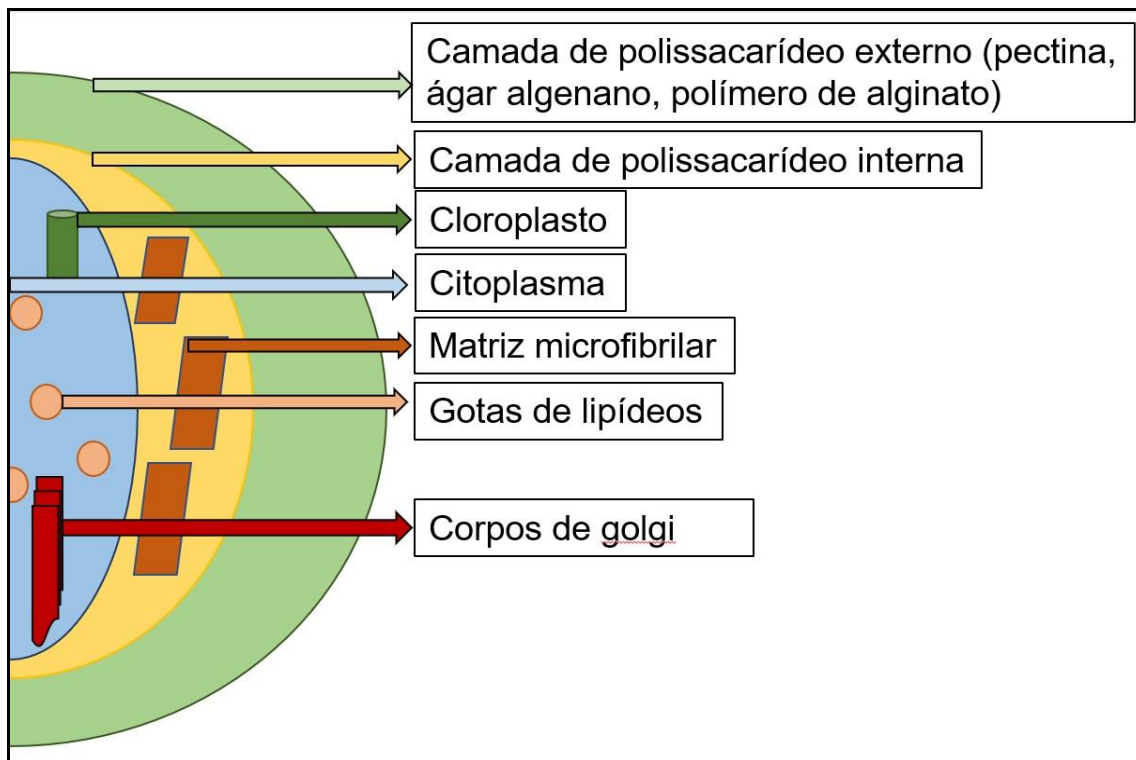


Figura 8 – Componentes típicos de uma parede celular de uma microalga (modificado de Ananthia et al.<sup>125</sup>, e suas respectivas referências).

### 2.9.1. Físico

Técnicas que envolvem o pré-tratamento físico se dividem em dois tipos, os mecânicos e os por irradiação, alterando o tamanho da partícula, áreas de superfície, cristalização de biomassa e polimerização<sup>183</sup>. Normalmente são os mais simples de aplicar e possuem menores impactos no ambiente, contudo são mais dependentes de energia e eletricidade<sup>125</sup>. Dentre os pré-tratamentos físicos, podemos citar os mecânicos (trituração, alta pressão e cortes em alta velocidade), por irradiação (micro-ondas, ultra-sonicação e campo elétrico de pulso) e térmicos (congelamento, termal, explosão a vapor e autoclave)<sup>125</sup>. A figura 9 a seguir resume as técnicas de ruptura física de microalgas.

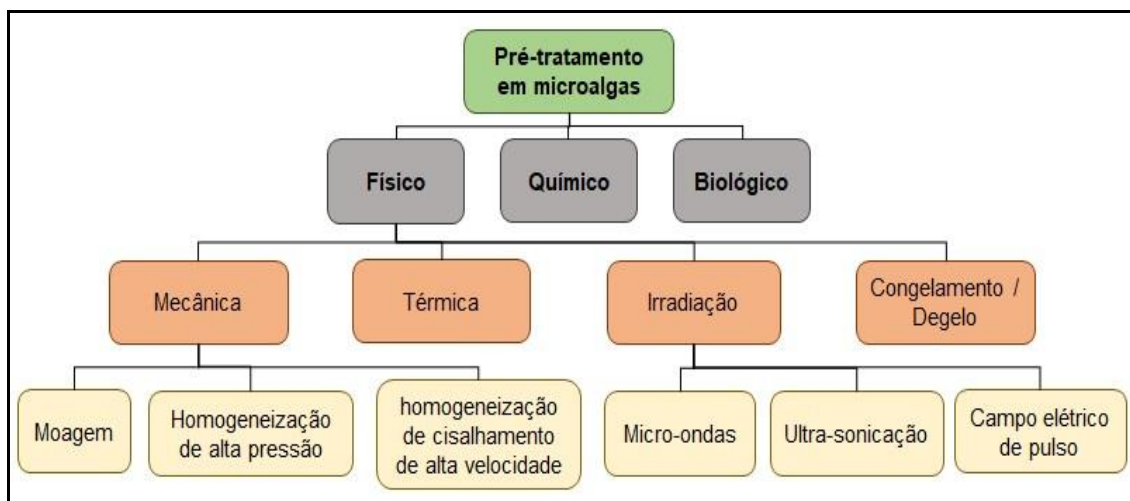


Figura 9 – Esquemática demonstrando os tipos de pré-tratamento físicos para biomassa de microalgas (modificado de Ananthia et al.<sup>125</sup>, e suas respectivas referências).

### 2.9.2. Químico

Os tratamentos químicos, na sua maioria, utilizam a variação extrema de pH para atacar a parede celular das microalgas, bem como alterar as ligações químicas de alguns compostos, muitas vezes em temperaturas por volta de 120 a 180°C, solubilizando assim as paredes poliméricas das algas, ou seja, tratamentos alcalinos ou ácidos degradam a matriz da celulose, despolimerizam a hemicelulose e provocam a hidrólise do amido<sup>184</sup>. Tais reações químicas, causam solvatação e saponificação que criam poros na parede da célula, facilitando a passagem de componentes intracelulares<sup>185</sup>.

Apesar da efetividade dos tratamentos químicos, eles são considerados o método mais tóxico, tanto para o ambiente quanto para todo o sistema de produção, podendo contaminar os produtos com compostos inibitórios e corroer os reatores, além de solubilizar os compostos de interesse. Quando isto ocorre, é necessária uma nova etapa para separar os compostos, neutralizar os químicos usados, causando um grande consumo de reagentes e produção de calor residual<sup>143,186</sup>.

Por fim, dentro dos tratamentos químicos, existem os oxidativos, utilizando ozono ou peróxido de hidrogênio, onde a oxidação das paredes celulares causa o surgimento de poros e a fragmentação da célula<sup>187</sup>.

### 2.9.3. Biológico

Nos tratamentos biológicos utiliza-se a habilidade natural de microrganismos e enzimas para quebrarem os componentes da parede celular. No caso das enzimas, estas hidrolisam os componentes da parede celular, como as glicoproteínas<sup>143,188</sup>. A

concentração de enzimas, a duração de tratamento, o pH, a temperatura e a concentração de biomassa afetam o desempenho do processo de desintegração celular. Esta técnica pode ser conjugada com outras para potencializar os efeitos e reduzir os custos<sup>143</sup>. Outras formas de pré-tratamentos biológicos são através de bactérias capazes de hidrolisarem as paredes das células, sejam essas bactérias em cultura pura ou então em um consórcio de bactérias; trata-se de uma técnica menos custosa que as enzimas<sup>188</sup>.

## **2.10. Recuperação da biomassa**

O procedimento final para a maioria dos cultivos de microalgas é a recuperação da biomassa, processo que muitas vezes representa à volta de 30% dos custos totais. Isto é devido à dificuldade em separar a biomassa da água<sup>189</sup>. Dependendo do método de recuperação, ele pode envolver mais de uma etapa, com estágios físicos, químicos e biológicos dissociando sólidos de líquidos<sup>190</sup>. Comumente, o processo de extração se divide em duas etapas, recuperação em massa e espessamento<sup>19</sup>.

### **2.10.1. Físico**

Os métodos de extração física são os que mais consomem energia, contudo são mais simples e não contaminam a biomassa. Podemos citar a centrifugação (força centrífuga que separa a biomassa do fluido, viável para todas as espécies de microalgas), filtração (membranas que retêm a biomassa, mas deixam passar a água) e flotação (uso de bolhas de gás para carregar a biomassa para a superfície)<sup>173,174</sup>. A sedimentação por gravidade chega a ser uma exceção pois não consome energia, porém é altamente dependente da espécie usada no cultivo, demora muito tempo, pode deteriorar a biomassa e recupera pouca biomassa<sup>174</sup>.

### **2.10.2. Químico**

Os métodos químicos usam reagentes para agregar as microalgas que depois passam a sedimentar. Para que tal ocorra, sais metálicos, ou polímeros são utilizados para neutralizar a carga negativa das células<sup>173,175</sup>. Apesar de ser muito usado e de ter sua efetividade confirmada por vários trabalhos, tais flocculantes podem ser altamente tóxicos, não são biodegradáveis e geram muito lodo, que precisa de ser posteriormente tratado. Outro grande problema dos flocculantes é a necessidade de remover os íons metálicos da biomassa e do produto, dependendo altas quantidades de água<sup>174,191</sup>.

### **2.10.3. Biológico**

Os métodos biológicos envolvem a aplicação de compostos/polímeros de origem biológica ou diretamente microrganismos capazes de agregar a biomassa. No caso dos polímeros de origem biológica, estes podem ser provenientes de plantas, bactérias, fungos, animais e até mesmo das próprias microalgas. Estes biofloculantes podem ser carboidratos, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, polifenóis e glicoproteínas. Esta opção de floculação é considerada menos custosa em relação ao uso de químicos ou de produtos inorgânicos, além de serem eficientes, sustentáveis e biodegradáveis<sup>173,191</sup>.

## **2.11. Efluentes industriais**

A água é um recurso extremamente valioso e que depois de usado, necessita de passar por várias etapas (naturais ou artificiais) para chegar ao seu estado original. Os tratamentos convencionais de efluentes são dispendiosos, nomeadamente ao nível da energia e dos reagentes. Ainda assim, os efluentes tratados nem sempre cumprem a os requisitos para poderem ser descarregados nos meios recetores<sup>192</sup>. Várias metodologias inovadoras têm sido propostas para complementar os sistemas convencionais ou tentar substituí-las, mas nem sempre se constituem como uma alternativa viável, prática e sustentável para a maioria das situações<sup>192,193</sup>.

### **2.11.1. Regras, qualidade da água, propriedades e estatutos**

Cada região do globo, devido às suas particularidades e necessidades, lida de uma forma diferente com os seus recursos hídricos e efluentes. Contudo, apesar dessa multiplicidade de fatores e contextos, a qualidade da água para consumo deve ser sempre a mesma e o ideal seria que o efluente descartado seja o mais próximo possível do seu estado original. Desde 1956, as Nações Unidas junto com seus estados-membros, buscam meios de padronizar as normas de qualidade da água, bem como as formas de tratamento, limites de concentração de compostos, formas de reaproveitamento, etc<sup>194,195</sup>. A partir destes esforços, vários parâmetros e guias foram criados e usados como base para as leis ambientais e de qualidade da água para inúmeros países. Com base nessas orientações, a União Europeia publicou a diretiva 2000/60/EC de 23 de outubro de 2000<sup>196</sup>, estabelecendo uma estrutura sólida para ação sobre política conjunta sobre a água. Em consequência desta diretiva, todos os países da UE, passaram a reformular e adaptar as suas leis, tal como Portugal que em 29 de dezembro de 2005 aprovou a Lei n.º 58/2005, a Lei da Água<sup>197</sup>, que rege a forma de gestão das águas no território nacional. Esta lei, em conjunto com o Decreto-Lei n.º

236/98 de 1 de agosto de 1998<sup>198</sup> e sua atualização em 2007 para o Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de agosto<sup>199</sup> determinam os parâmetros para que a água seja considerada segura para consumo humano e sobre os valores limites de emissão na descarga de águas residuais, algo que todas as empresas devem seguir. A tabela 3 a seguir apresenta resumidamente os parâmetros limites para emissão de efluentes

Parâmetros	Expressão dos resultados	Valor Limite de Emissão
pH	Escala de Sorensen	6,0 – 9,0
Temperatura	°C	Aumento de 3°C em relação ao meio receptor
CBO5 20 °C	mg/l O <sub>2</sub>	40
CQO	mg/l O <sub>2</sub>	150
SST	mg/L	60
Cor	-	Não visível na diluição 1:20
Cheiro	-	Não detectável na diluição 1:20
Cloro residual livre	mg/L Cl <sub>2</sub>	0,5
Cloro residual total	mg/L Cl <sub>2</sub>	1,0
Fósforo total	mg/L P	10; 3 (em águas que alimentem lagoas ou albufeiras); 0,5 (em lagoas ou albufeiras)
Azoto amoniacal	mg/L NH <sub>4</sub>	10
Azoto total	mg/L N	15
Nitratos	mg/L NO <sub>3</sub>	50
Ferro ; Manganés ; Crómio e Níquel total	mg/L Fe; Mn; Cr; Ni	2,0
Fenóis	mg/L C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	0,5
Mercurio total	mg/L Hg	0,05
Óleos e gorduras	mg/L	15

Tabela 3 – Valores limite de emissão na descarga de águas residuais (modificado de Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto<sup>198</sup>, e suas respectivas referências).

### 2.11.2. Efluente da indústria do papel

As indústrias da floresta, durante os últimos anos, tem tido um aumento na demanda de seus produtos, não apenas produtos de papel, mas também a energia da biomassa florestal, pellets de madeira e até fibras de carbono<sup>200</sup>. No que respeita ao papel, a indústria apresenta consumos específicos de água significativos, podendo variar entre os 5 e os 100 m<sup>3</sup> de água para a produção de uma tonelada de papel<sup>201,202</sup>. Este alto consumo de água, resulta em uma grande produção de efluentes, que podem conter até 700 substâncias orgânicas e inorgânicas capazes de causar danos ambientais e à saúde humana, substâncias como halogénios orgânicos adsorvíveis, compostos fenólicos, corantes, etc<sup>200,203</sup>. Algumas das principais características dos efluentes originários da indústria do papel estão representados na tabela 4, bem como as suas respectivas referências.



Efluentes de diferentes operações	pH	CQO (mg/L)	BDO (mg/L)	TSS
Depósito de madeira e lascas	7	1275	556	7150
Polpação termomecânica	4,0 - 4,2	3343 - 5600	2800	330 - 510
polpação termomecânica química	6,3 - 7,43	7521 - 115000	3000	350
Seção de cozimento Kraft	13,5	1669,7 - 4112	460	40
Operações do processo de polpação	5,5	9065	2440	1309
Branqueamento	8,2	3680	352	950
Máquina de papel	6,5	1116	641	645
Fábrica de celulose e papel integrada	6,5	3791	1197	1241
Fábrica de papel reciclado	6,1 - 8,3	3380 - 4930	1650 - 2565	1900 - 3138

Tabela 4 – Parâmetros típicos de efluentes provenientes de diferentes processos na indústria da pasta e de papel (modificado de Kamali et al.<sup>200</sup>, Ashrafi et al.<sup>204</sup>, Toczyłowska-Mamińska<sup>202</sup> e suas respectivas referências).

Como foi mencionado anteriormente, nem sempre após os tratamentos, os efluentes saem sem nenhum contaminante, ou em níveis apropriados para descarte, além de os métodos convencionais adicionarem um grau elevado de custos e complexidade. O uso de microalgas em efluentes industriais serviria como uma alternativa simples, econômica e efetiva para complementar o sistema de tratamentos, buscando um balanço entre fatores econômicos, logísticos e ecológicos. No caso de efluentes da indústria do papel, estudos foram feitos para testar a capacidade de as microalgas crescerem em tais condições; na maioria dos estudos foram testados efluentes que já passaram por outros tratamentos, ou que foram diluídos e misturados com outros efluentes (normalmente de origem domésticas ou da indústria alimentícia).

Gentili em 2014<sup>205</sup>, estudou o desempenho das algas *Monoraphidium minutum* (nome aceite taxonomicamente e sinônimo de *Selenastrum minutum*), *Scenedesmus dimorphus* e *Scenedesmus sp.* com efluente de celulose e do papel misturada com outros (lodo de leite, efluente municipal e de final da indústria leiteira), para diluição e como fonte de nutrientes para as microalgas. A microalga cresceu bem em todas as misturas, com acumulação de lípidos até 37% em relação a biomassa seca e uma remoção de 79,8% em média de matéria orgânica em 6 dias.

Em outro trabalho, Usha et al. (2016)<sup>206</sup>, demonstrou a capacidade da microalga *Scenedesmus sp.* de remediar efluente derivado da indústria da pasta para, removendo até 75% de matéria orgânica no efluente diluído a 60%, em 28 dias de cultivo.

Tao et al. em 2017<sup>123</sup>, obteve uma remoção de 34% em média de matéria orgânica de um efluente da digestão anaeróbia da biomassa da indústria de celulose e papel, em 21 dias, através da microalga *Scenedesmus acuminatus*.

Considerando estes estudos, o tratamento com microalgas foi capaz de alcançar uma média de 62,9 % de remoção para CQO e cerca de 80% da maioria dos nutrientes como azoto e fósforo (e seus derivados) além de produzir altas quantidades de biomassas ricas em lípidos e proteínas.

### **2.11.3. Efluente da Indústria têxtil**

O fabrico de produtos têxteis, é uma das maiores e mais antigas forma de indústria ainda presentes, provendo empregos para todas as escalas de profissionais, inclusive para aqueles sem nenhuma experiência prévia na área, se tornando assim uma importante fonte de renda em vários países<sup>207,208</sup>. Resumidamente, a indústria têxtil se divide em três tipos baseados no tipo de fibras que são usadas para a confecção de seus produtos, sendo elas a partir de celulose (como algodão, linho, cânhamo e entre outros), fibras proteicas (lã, angorá, casimira etc) e os sintéticos (poliéster, nylon, acetato e vários outros), e a partir desta fibra, outras etapas para o processamento serão definidas, como a escolha dos produtos químicos e corantes a serem utilizados para o tratamento dos tecidos. Dentre os possíveis tipos de corantes, podemos citar os corantes reativos, corantes ácidos, corantes dispersivos e vários outros<sup>209</sup>. Devido ao grande uso de químicos e corantes, a indústria têxtil depende do uso de imensa quantidade de água, principalmente para a lavagem destes químicos e corantes em excesso nos tecidos, com cerca de 115 m<sup>3</sup> de água para cada tonelada de tecido produzido; outros autores estimam valores na gama dos 50 a 250 m<sup>3</sup>/tonelada de produto têxtil<sup>210,211,212</sup>. A tabela 5 apresenta valores típicos para as características dos efluentes da indústria têxtil. As figuras 10 e 11 identificam as fontes dos principais poluentes e as principais formas de remoção de corantes dos efluentes respetivamente.

Parâmetros	Variação
pH	5 - 13
Temperatura (°C)	35 - 62
Sólidos dissolvidos totais (mg/L)	1500 - 12000
BDO (mg/L)	10 - 6000
CQO (mg/L)	100 - 30000
Sólidos suspensos totais (mg/L)	15 - 8000
Cloro (mg/L)	40 - 6000
Cloro livre (mg/L)	<10
Sódio (mg/L)	400 - 7000
Elementos traços (Fe, Zn, Cu, As, Ni, B, F, Mn, V, Hg, PO <sub>4</sub> e Cn) (mg/L)	2 - <15
Óleos e graxas (mg/L)	5 - 50
Azoto Kjeldahl total (mg/L)	10 - 80
NO <sub>3</sub> -N (mg/L)	0,025 - 9,4
Amônia livre (mg/L)	<10
SO <sub>4</sub> (mg/L)	500 - 1000
Sílica (mg/L)	<15
Cor (Pt-Co)	50 - 2500
Cor (ADMI)	7 - 4750

Tabela 5 – Características de efluentes da indústria têxtil de acordo com seus respectivos processos (modificado de Ghaly et al.<sup>209</sup>, Yaseen et al.<sup>213</sup> e suas respectivas referências).

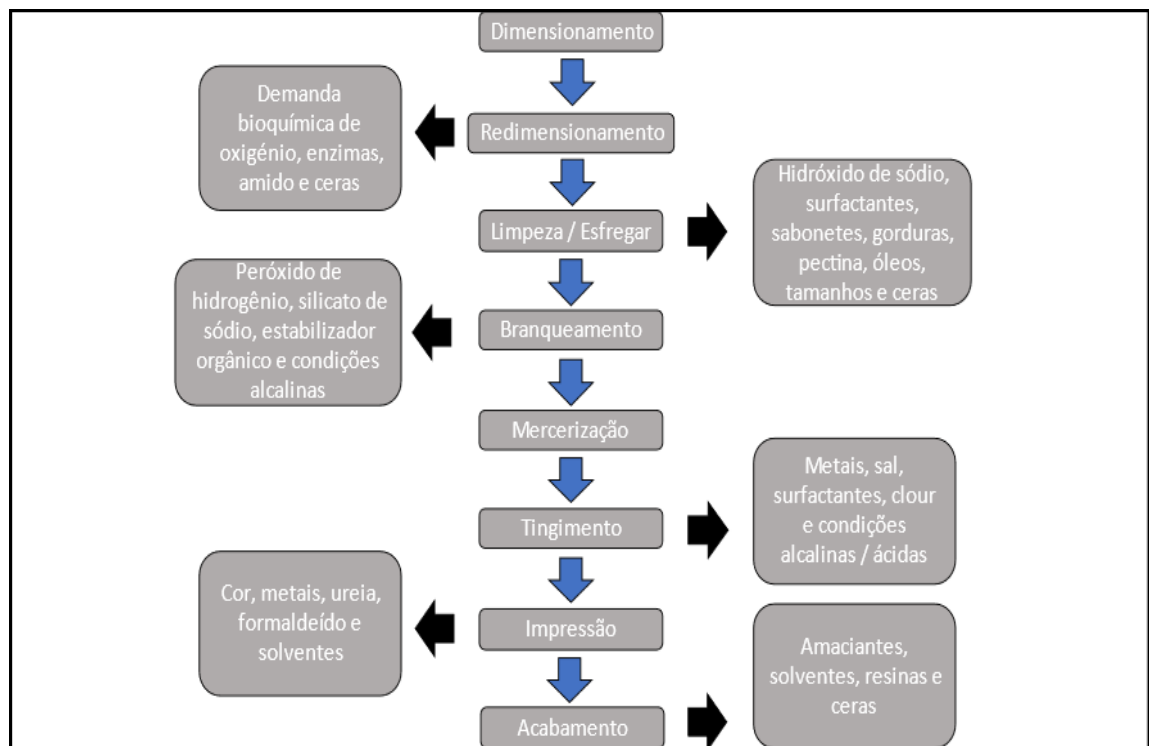


Figura 10 – Principais poluentes descartados em cada etapa dos processos têxteis húmidos (modificado de Yaseen et al.<sup>213</sup>, e suas respectivas referências).

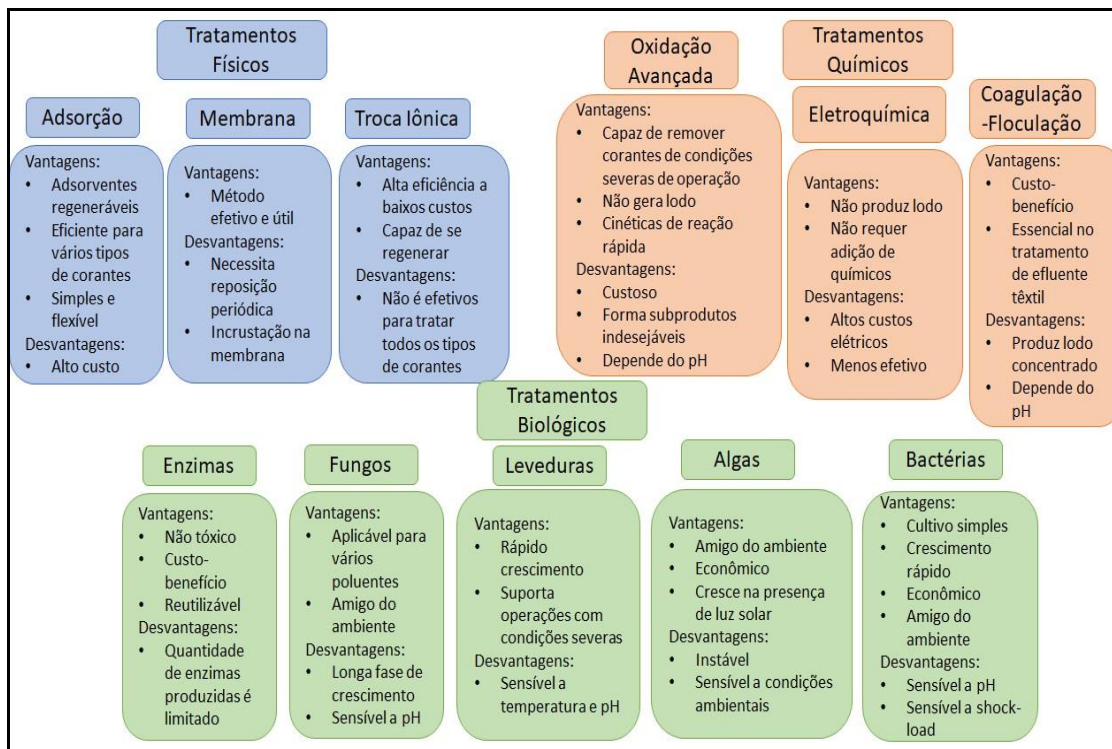


Figura 11 – Métodos utilizados para remoção de corantes em efluentes (modificado de Samsami et al.<sup>214</sup>, e suas respetivas referências).

No caso do tratamento de efluentes da indústria têxtil, as microalgas chamam atenção pelo fato de serem capazes de remover grandes percentagens de corantes do efluente, além de tratar nutrientes e absorver metais pesados<sup>215-218</sup>. Muitos trabalhos relacionados a tratamento de efluentes da indústria têxtil por microalgas, cita o uso de um consórcio entre microalgas e bactérias, ou então um duplo sistema biológico de tratamento (aeróbico e anaeróbico), onde cada sistema/microrganismo se especializa em remover um determinado composto e auxiliar a sobrevivência e crescimento dos outros<sup>216,217,218</sup>.

Em 2019, Dhaouefi et al.<sup>217</sup>, testou a utilização de um sistema de duas etapas para o tratamento de efluentes da indústria têxtil. Este sistema consistia em uma primeira fase contendo um reator de digestão anaeróbica e o efluente resultante era tratado na segunda fase, que é um fotobioreator contendo um consórcio de microalgas (96% *Microspora quadrata*; 2% *Chlorella vulgaris* e 2% de outros). Através deste método foi possível remover valores acima de 90% dos corantes diluídos, como o dispersante laranja-3 e o dispersante azul e 43,8% de matéria orgânica em 8 dias.

Lim et al.<sup>215</sup> e El-Kassas & Mohamed<sup>219</sup> (em 2010 e 2014 respetivamente), estudaram a capacidade da microalga *Chlorella vulgaris* em remediar efluentes da indústria têxtil, obtendo uma remoção de matéria orgânica na média de 54,7% (com concentrações de

efluente de 90 e 30% respectivamente para cada trabalho) e uma remoção em média de 55,4% dos corantes dissolvidos.

Por fim, Kumar et al.<sup>216</sup>, em 2018, através do uso de um consorcio de microalgas, foi capaz de obter em média 55% de remoção de matéria orgânica em seus cinco experimentos, além de 70% em média de descoloração do meio (variando de 10 a 30 dias de cultivo) de efluentes provenientes da indústria têxtil com concentração de 88,8%.

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1. Materiais**

#### **3.1.1. Reagentes**

Neste projeto de pesquisa, foram utilizados os seguintes reagentes: água desmineralizada, obtida no sistema RIOS™ 3 (Milipore, Estados Unidos); ácido sulfúrico (Riedel-de Haën / Sigma-Aldrich, Estados Unidos); solução indicadora de ferroina (Merck, Alemanha); dicromato de potássio (Sigma-Aldrich, Estados Unidos); sulfato de prata (Sigma-Alorich, Estados Unidos); sulfato de amônio ferroso (Merck, Alemanha); sulfato de mercúrio (Scharlau, Espanha); glucose (Krisch Pharma, Alemanha).

#### **3.1.2. Microalga, meio de cultura e efluentes**

Neste trabalho, utilizou-se uma microalga que foi identificada após contaminar um cultivo de *Chlorella vulgaris*. Através da descrição contida nos livros “*The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to freshwater and terrestrial algae*”<sup>53</sup> e “*Easy identification of the most common Freshwater Algae. A guide for the identification of microscopic algae in South African freshwaters*”<sup>35</sup>, foi possível identificar o gênero da microalga como *Selenastrum sp.* (representada na figura 12), um gênero comum em todo o globo e capaz de se espalhar e contaminar facilmente ambientes aquáticos graças a sua reprodução por esporos<sup>36</sup>.

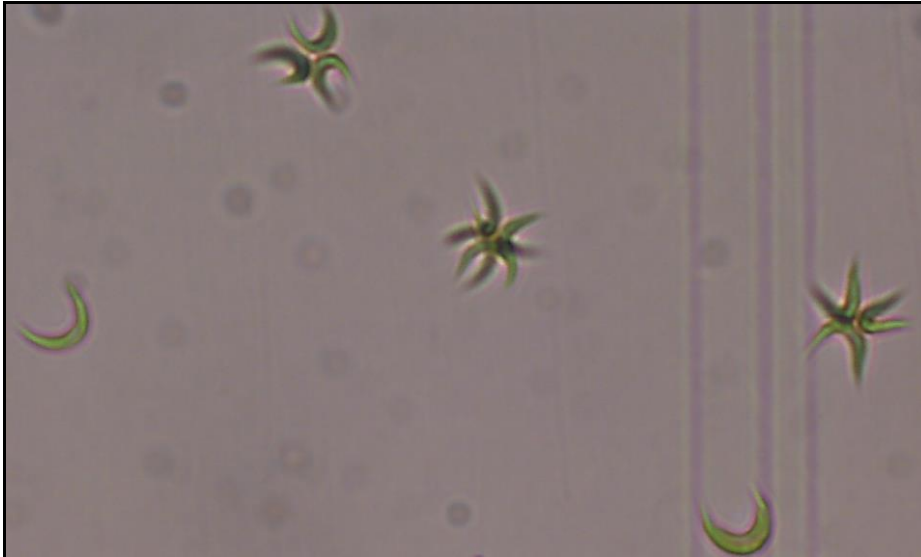


Figura 12 – *Selenastrum sp.* aproximado em 40x.

O meio de cultura escolhido para o crescimento (cultivo controlo) e para suplementação (cultivo em efluentes) dos efluentes, foi o GoldMedium Fresh-Water Species (GM-FWS), preparado através dos compostos fornecidos pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal). A partir dos nutrientes, foram feitas 4 soluções stock (soluções 1, 2, 3 e 4), que foram esterilizadas a 121°C em autoclave (2540mL autoclave – Heidolph Tuttnauer, Alemanha). Para as condições standard de cultura das microalgas, são usados 10 ml de cada solução stock, para cada litro de meio (ou seja, 40 mL de nutrientes para cada L de cultivo), conduzindo às concentrações finais de 70 mg N/L, 20,46 mg P/L, 14,8 mg Mg/L, 13,6 mg Ca/L, para além dos oligómeros e vitaminas.

Os efluentes (representados pela sua versão filtrada na figura 13) foram obtidos de duas indústrias, efluente da indústria têxtil (Fitecom, Tortosendo, Portugal) e da indústria da pasta para papel (Celtejo, Vila Velha de Ródão, Portugal), ambos possuindo uma média de 4,3 mg/L de nitrato e fosfato dissolvidos, um pH por volta de 7,69, níveis de carência química de oxigénio na ordem dos 400 a 500 mgO<sub>2</sub>/L. Para além destes parâmetros, o efluente têxtil possuía 4,1 mg/L de oxigénio dissolvido e um potencial redox de 163 mV, enquanto o efluente da pasta do papel apresentava 1,5 mg/l de oxigénio dissolvido e um potencial redox de -433 mV. Em virtude de os efluentes conterem baixas quantidades de nutrientes (cerca de 25 mg/L de nitrato e de fosfato seria o mínimo para um cultivo saudável<sup>53</sup>, estes foram suplementados com o meio GM-FWS com concentrações standard.



Figura 13 – Efluentes filtrados da pasta para papel e têxtil, da esquerda para direita respetivamente.

### 3.1.3. Instalação

As microalgas foram cultivadas em frascos modelo “Schott” (ensaio principal), Erlenmeyeres de 150mL e em “frascos de lavagem de gases” de 500mL (ensaios de testes). Para controlo da temperatura (23°C), foi utilizado um banho térmico de vidro transparente, com 50% do seu volume preenchido com água e temperatura controlada através de um outro banho termostático (LAUDA Proline Edition X), de modo a minimizar as variações térmicas que influenciam o crescimento das microalgas. A temperatura do banho de vidro foi uniformizada por agitadores magnéticos.

Este sistema está montando numa estante de cultura de microalgas (representada na figura 14), fornecida pela empresa Aqualgae (Viana do Castelo, Portugal). O ar era usado como fonte de carbono inorgânico e como agitação do sistema, sendo fornecido através do sistema de ar comprimido do laboratório, após passar por filtros de nylon, e alimentado a um caudal de 0,4L/L/min.

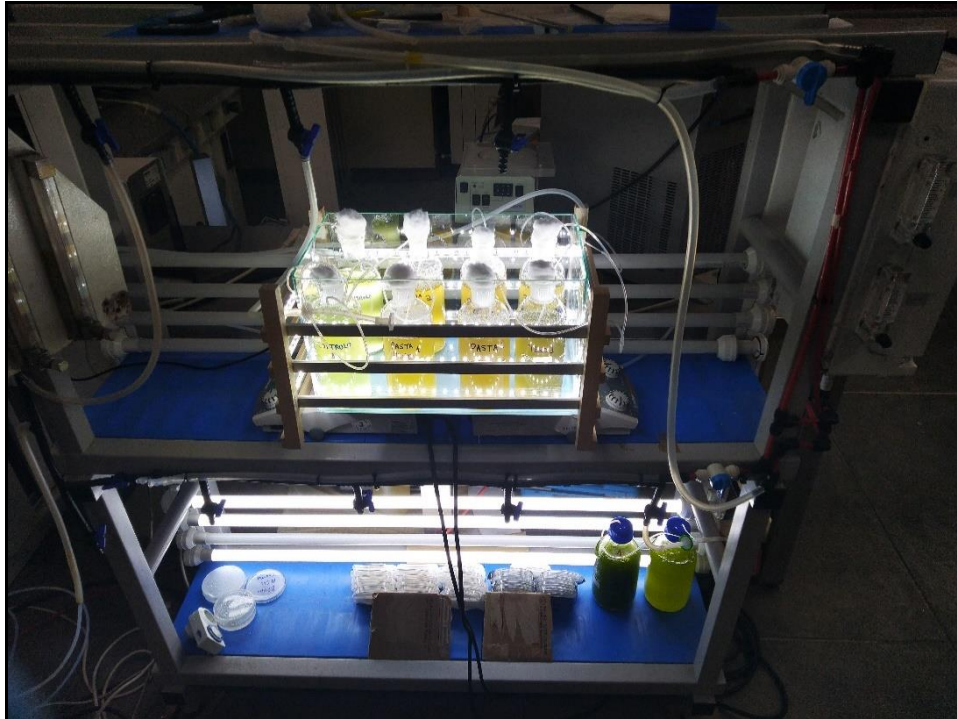


Figura 14 – Estante para cultura de microalgas.

A iluminação provém de um sistema de LEDs PRO, da marca MAXLED, com possibilidade de controlo da intensidade luminosa, entre 2 e 312  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Além do controlo de intensidade de radiação, havia também um controlo do período de luz e noite através de um controlador digital.

O fluxo de ar era controlado principalmente pelos filtros de nylon (Simplepure TM Syringe Filter, 0,45 $\mu\text{m}$ , Membrane Solutions, Estados Unidos) e pelas válvulas contidas na estante de cultivo. Todo este sistema está representando na figura 15 a seguir.



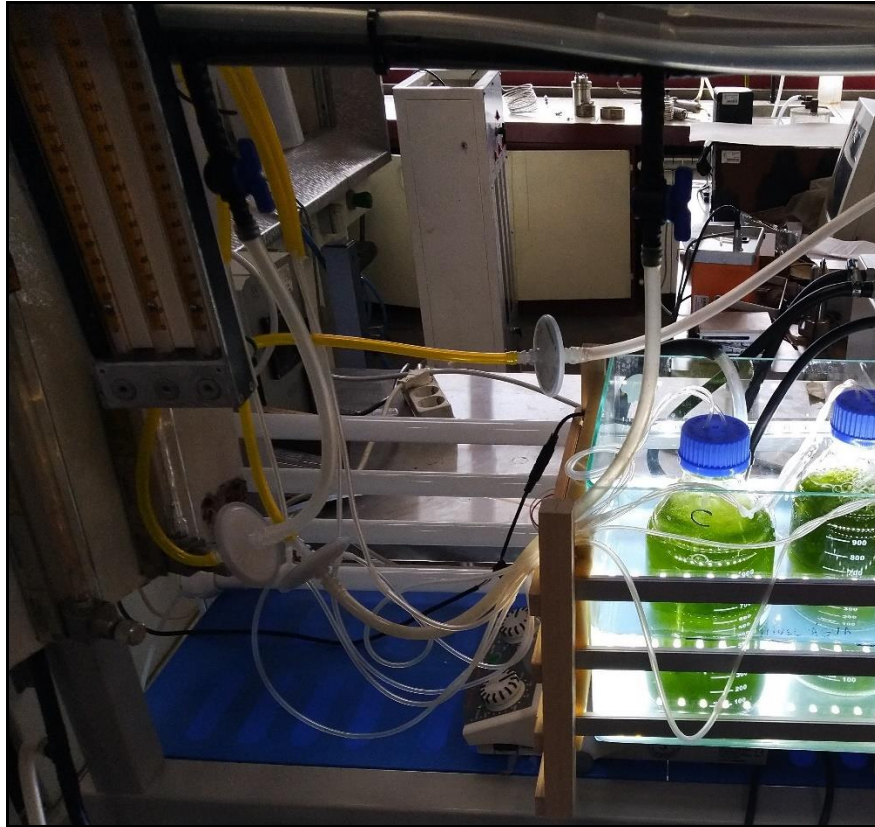


Figura 15 – Filtros de nylon e válvulas utilizadas na limpeza e controle do fluxo de ar.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Produção de biomassa algal

A etapa de produção da biomassa (representado na figura 16) foi realizada em diferentes bio-reatores, variando o tamanho e formato, de forma a testar a adaptação e sobrevivência da *Selenastrum sp.* nos efluentes industriais. Todos os cultivos, tanto preliminares quanto os principais foram feitos em dois reatores (duplicatas).

Após comprovar o crescimento da microalga nos efluentes, procurou-se controlar os parâmetros externos (temperatura, agitação, fluxo de ar, nutrientes, iluminação, etc.) para garantir que os principais efeitos do cultivo fossem relativos a interação da microalga com o efluente.

Após se ter verificado que a alga sobrevivia nos efluentes, colocou-se o foco no seu efeito sobre os compostos orgânicos, a cor, os odores e possivelmente, outros compostos dissolvidos nos efluentes, analisando a carência química de oxigênio (CQO), o pH, o oxigênio dissolvido, o crescimento da biomassa e a variação da cor do efluente (espectro UV-visível do efluente).



Figura 16 – Diferentes etapas de cultivo da microalga *Selenastrum sp.*.

### 3.2.1.1. Ensaios preliminares

Após a identificação da nova alga, *Selenastrum sp.*, foram realizados testes preliminares em reatores pequenos, para avaliar o potencial de crescimento desta microalga em efluentes industriais e condições de estresse.

O primeiro teste envolveu o cultivo da *Selenastrum sp.* em Erlenmeyers de 150mL, diretamente nos efluentes filtrados (poros de 45 $\mu$ m), tendo-se adicionado 10% (v/v) de suspensão com a microalga. Os reatores foram alimentados com ar atmosférico (como fonte de carbono inorgânico e mistura); o cultivo durou 10 dias e no final determinou-se o CQO. O período inicial e final deste cultivo está representado na figura 17.

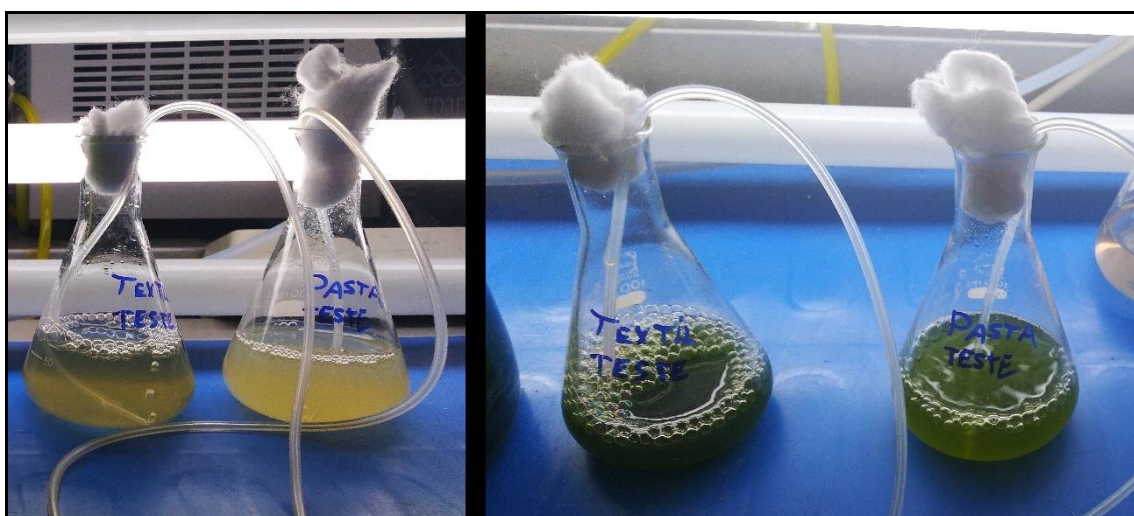


Figura 17 – Ensaio preliminar para a sobrevivência da *Selenastrum sp.*.

Confirmada a sobrevivência da *Selenastrum sp.* nos efluentes, foi realizado um conjunto de testes em maior escala (frascos de 500mL) com réplicas (demonstrada na figura 18), para observar o seu comportamento num horizonte temporal maior. Dentro deste teste, prepararam-se os seguintes cultivos:

- Cultivo controlo (com meio GM-FWS);

- Cultivo em efluente têxtil 90% (v/v); 10% (v/v) de suspensão com as microalgas e meio GM-FWS (concentração referente ao volume de cultivo);
- Cultivo em efluente da pasta para papel 90% (v/v); 10% (v/v) de suspensão com as microalgas e meio GM-FWS (concentração referente ao volume de cultivo);
- Cultivo no efluente da pasta para papel 67,5% (v/v), este ensaio foi realizado devido ao receio do ambiente altamente redutor do efluente do papel causar dificuldades no crescimento (o valor foi escolhido baseado em proporções usadas em outros trabalhos similares, os quais variavam entre 60 e 75% de concentração de efluente<sup>203,204</sup>).

Os ensaios foram seguidos através da contagem de células em placas de “Neubauer Improved” e pela determinação da CQO, realizados de 3 em 3 dias. Outros parâmetros, tais como oxigénio dissolvido e pH eram medidos no início, meio e fim do cultivo. O peso seco da biomassa filtrada (Filter Lab MFV3 – glass microfibre – poro de 1,2µm) foi determinado no último dia de cultivo, visto que nos primeiros dias os valores eram muito baixos para detetar diferenças.



Figura 18 – Ensaio preliminar para o crescimento da *Selenastrum sp.*.

### 3.2.1.2. Ensaio principal em reator de 1L

Com base no conhecimento obtido nos ensaios preliminares, foram realizados novos cultivos em frascos Schott de 1L com duração de 8 dias (192 horas); infelizmente os frascos Schott de 1L, correspondentes aos ensaios principais que se pretendiam realizar, não cabiam no banho térmico de vidro, pelo que foram realizados em momentos diferentes. Este cultivo está ilustrado pela figura 19 a seguir.



Figura 19 – Ensaio e cultivo principal da *Selenastrum sp.*.

Foi também realizado um teste de cultivo controlo com adição de 500mg de glucose (teoricamente correspondente a 533 mg O<sub>2</sub>/L; experimentalmente o valor determinado foi cerca de 600 mgO<sub>2</sub>/L), que serviu para comparar a bio-conversão de um composto de elevada biodegradabilidade (glucose) com a dos compostos dos efluentes (representado na figura 20). Mantiveram-se constantes os parâmetros de luz (195 de  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de luz por 12 horas/dia), aeração (fluxo de ar atmosférico de 1 L por

minuto), nutrientes (meio standard GM-FWS), concentração inicial de microalgas (por volta de 800.000 Cel/L); efluentes a 90% de concentração.



Figura 20 – Ensaio principal com réplicas para controle e efluente têxtil; e com o cultivo controle com adição de glucose.

Considerando as flutuações observadas em etapas anteriores em alguns parâmetros de controlo do processo, nomeadamente o CQO e a cor, definiu-se um protocolo analítico mais detalhado para cada amostragem, que se descreve a seguir:

- Retiravam-se cerca de 10mL de amostra de cada frasco de cultivo, que se colocavam em tubos que passavam por um tratamento ultrassónico suave em banho (Elma S30H Elmasonic, Suíça) durante 5 minutos, para libertar compostos que poderia estar adsorvido nas paredes das células;
- Após este tratamento, 1mL era separado para contagem e caracterização da morfologia celular (sempre com diluição 1:10 devido ao alto teor celular);
- A restante suspensão era filtrada (filtros com poro de 1,2  $\mu\text{m}$ ); 7,5mL de filtrado era usado para a análise da CQO (2,5mL cada amostra; triplicatas), sendo o restante usado para fazer leituras de absorvâncias na região do UV-visível, usando o espectrofotómetro Spectronic Helios Gamma, Thermo Fisher Scientific;
- Os filtros eram secos durante 24h e pesados para determinar o peso de biomassa seca.

### 3.2.2. Controlo do processo

É sabido que para avaliar o efeito de um determinado fator é essencial controlar os restantes. Acresce ainda a relevância da interação entre fatores. Assim, durante os testes de tratamento de efluentes com microalgas, procurou-se ao máximo controlar fatores como, intensidade luminosa, temperatura, nutrientes, número de células iniciais, evaporação e outros.

#### 3.2.2.1. Biomassa

Durante os ensaios, optou-se por monitorar a densidade da biomassa bem como o seu crescimento, peso e dimensões ao longo do tempo, através da contagem celular em placas de Neubauer Improved e observação microscópica acoplada a software especializado (Nikon Labophot 2 Microscope, Japão & Leica Application Suite "LAS", v4.13, Leica, Alemanha). Este sistema de contagem e aquisição de imagens estão ilustrados na figura 21 a seguir.

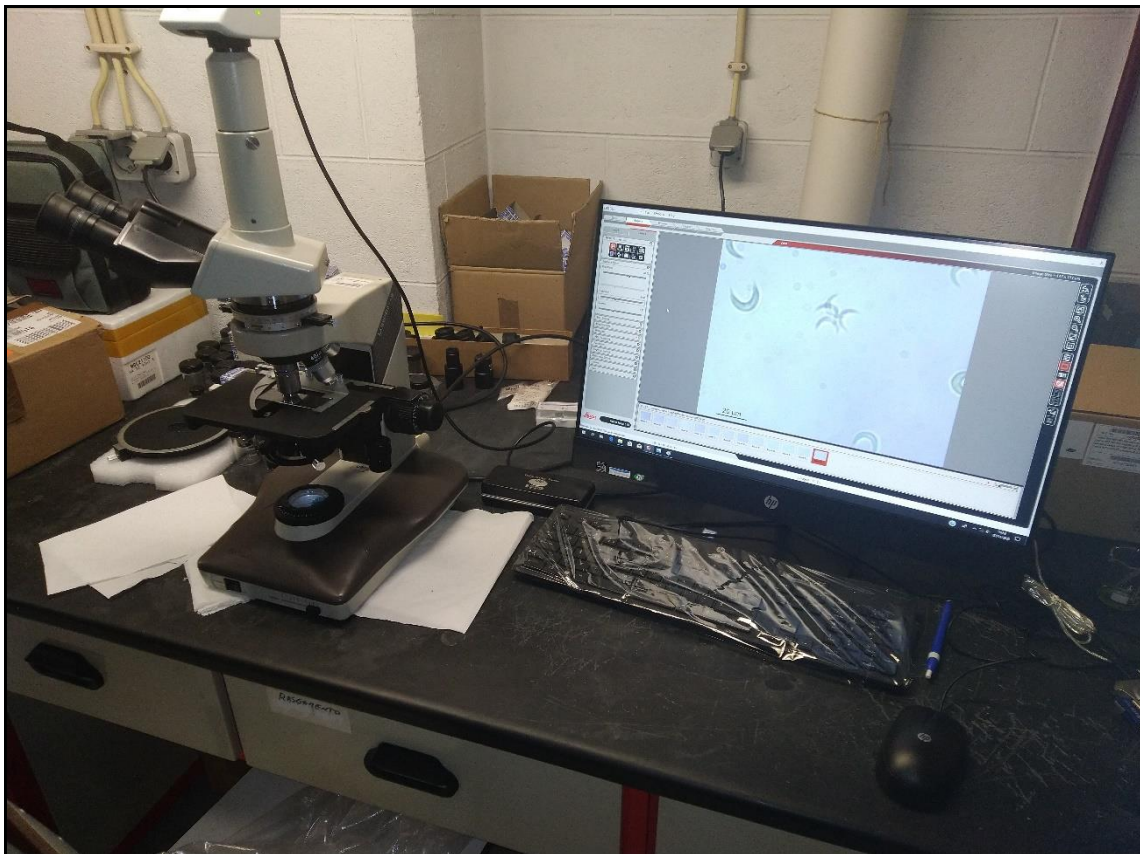


Figura 21 – Microscópio e aplicações utilizados durante os procedimentos.

Através deste equipamento, foi possível medir as dimensões das microalgas (comprimento e raio) e com isso estimar o volume celular, como podemos ver na figura

22. Considerava-se o maior e menor exemplar encontrado e fazia-se a média para determinar o volume aproximado das células naquele momento de cultivo. Para obter o volume, foi assumido que a forma da célula seria um cilindro e duas semiesferas, resultando na seguinte fórmula:

$$Volume = \pi \times raio^2 \times \left( \frac{4 \times raio}{3} + comprimento \right)$$

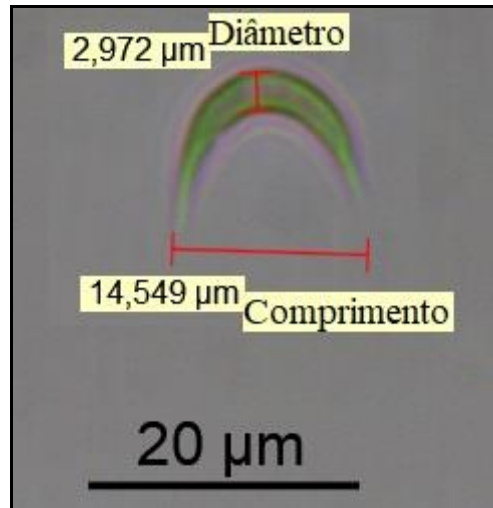


Figura 22 – Obtenção do diâmetro (diâmetro é igual ao raio x2) e do comprimento da microalga.

Para a realização da contagem, adicionou-se cerca de 1mL de amostra diluída e homogeneizada à lâmina de Neubauer, aplicando seguidamente a lamela; a concentração de células foi calculada, contando as células existentes nas 4 zonas específicas desta placa (cada uma possuindo uma área de 1 mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,1 mm) e aplicando a fórmula abaixo<sup>220</sup>.

$$Concentração\ celular = \frac{N^{\circ}\ de\ células\ contadas}{N^{\circ}\ de\ zonas \times Volume\ da\ zona\ (mL) \times Diluição}$$

Este procedimento foi adotado visando a apropriada caracterização do ensaio em apreço e tendo também em conta que a cor do efluente retira rigor à quantificação da biomassa por leitura da densidade ótica feita pelo espectrofotômetro.

Por fim, para completar a caracterização do crescimento da biomassa, era determinado o peso da biomassa seca, onde cerca de 7,5mL de cultivo era filtrado, seco e pesado (Sartorius A200S Analytical Balance, Sartorius, Alemanha). A figura 23 a seguir demonstra esta etapa.

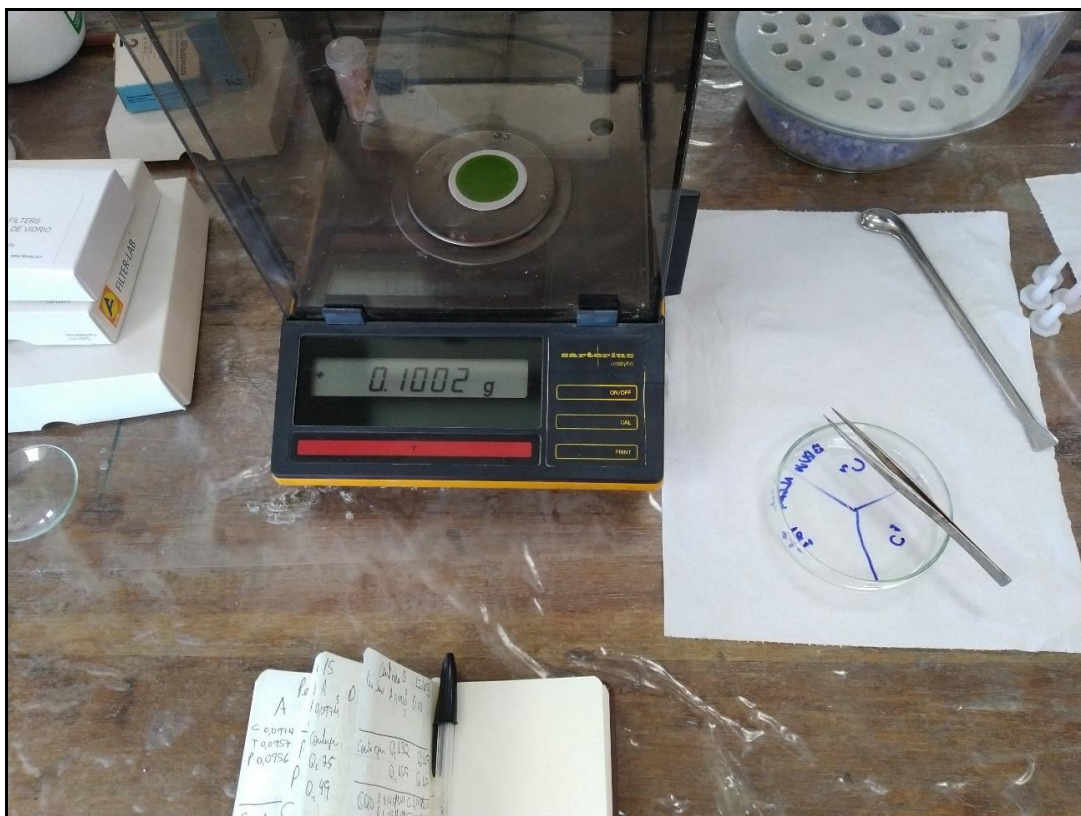


Figura 23 – Pesagem de biomassa seca.

### 3.2.2.2. Luminosidade

Graças ao sistema de LEDs implementado pelo meu colega André Cunha, bem como ao controlador digital de eletricidade, foi possível manter a intensidade luminosa estável ( $195 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), uniformemente distribuída, com um tempo de exposição diário de luz constante (12 horas) ao longo de todo o período de experimentação. A intensidade de radiação escolhida corresponde a cerca de 50% da intensidade luminosa máxima disponível, permitindo o crescimento das microalgas sem lhes causar estresse (sistema de iluminação ilustrado na figura 24).



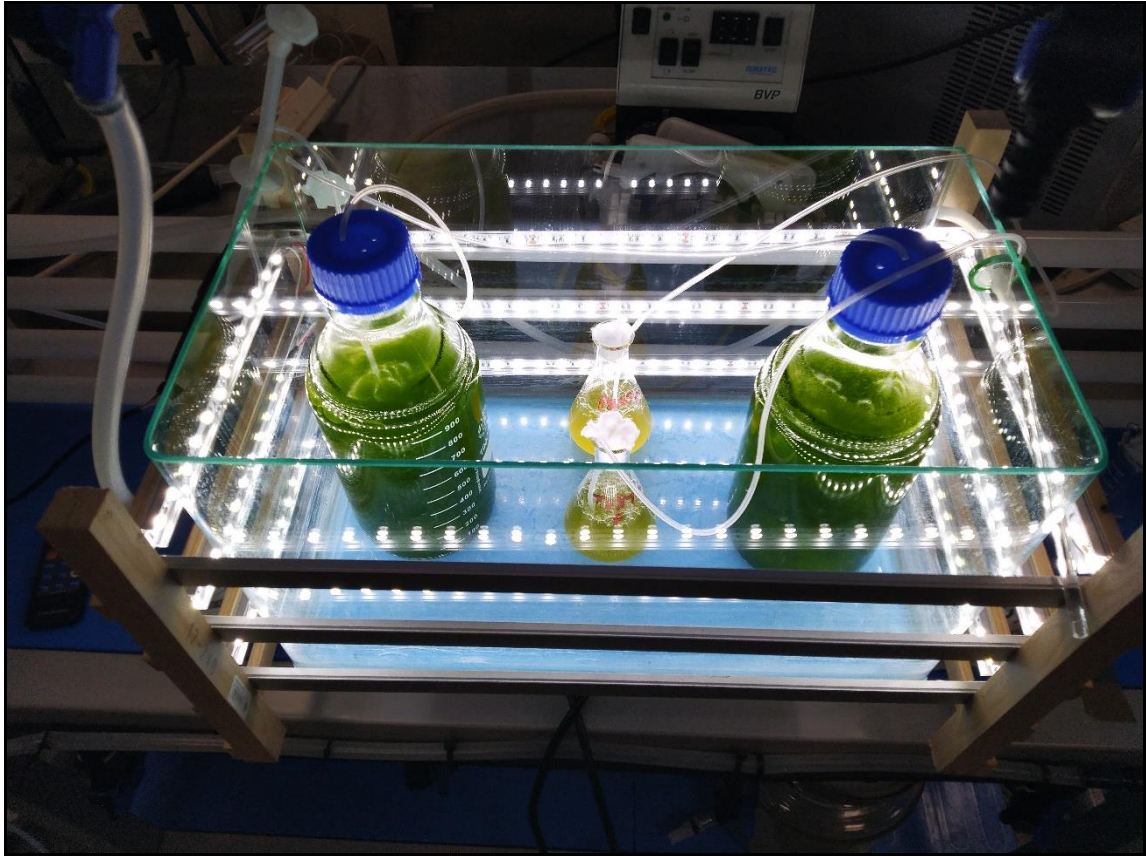


Figura 24 – Sistema de Leds utilizado nos cultivos.

### **3.2.2.3. Temperatura, fontes de carbono e outros parâmetros**

Como foi mencionado anteriormente, para manter a temperatura estável, utilizou-se um sistema de serpentinas de aço-inox colocadas dentro do banho de vidro nas quais circulava água aquecida; dentro do banho de vidro também havia agitação por barras magnéticas por forma a uniformizar a temperatura. Este sistema de controlo da temperatura está ilustrado na figura 25.

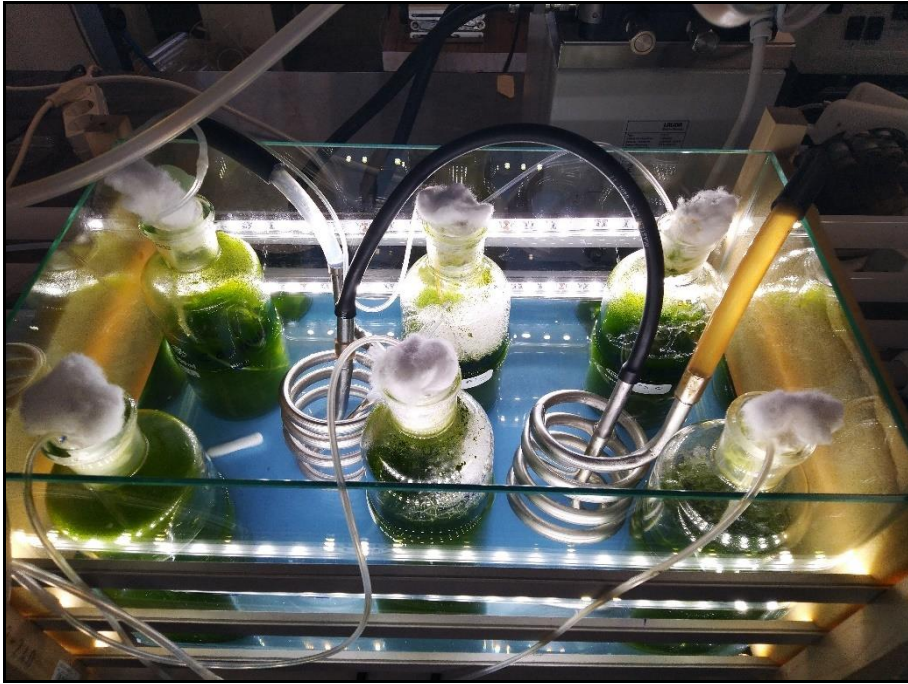


Figura 25 – Sistema de controlo da temperatura em uso.

Nutrientes como o azoto e o fósforo foram medidos apenas ao final dos cultivos. Para a sua determinação utilizaram-se kits de análise em cuvete da empresa Hach (Estados Unidos) (ilustrado na figura 26). Estes frascos continham químicos que reagem ao contato dos nutrientes e em seguida fazia-se uma leitura colorimétrica em espectrofotómetro (UV-visible Spectrophotometer Helios Gamma, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) (ilustrado na figura 27). A diferença entre a concentração inicial e final permitia determinar o respetivo consumo. No início e final dos cultivos também se determinou o valor do pH (Metrohm Combined pH glass electrode, Suíça) e do oxigénio dissolvido (OxiCal-SL, Merck Group, Alemanha).

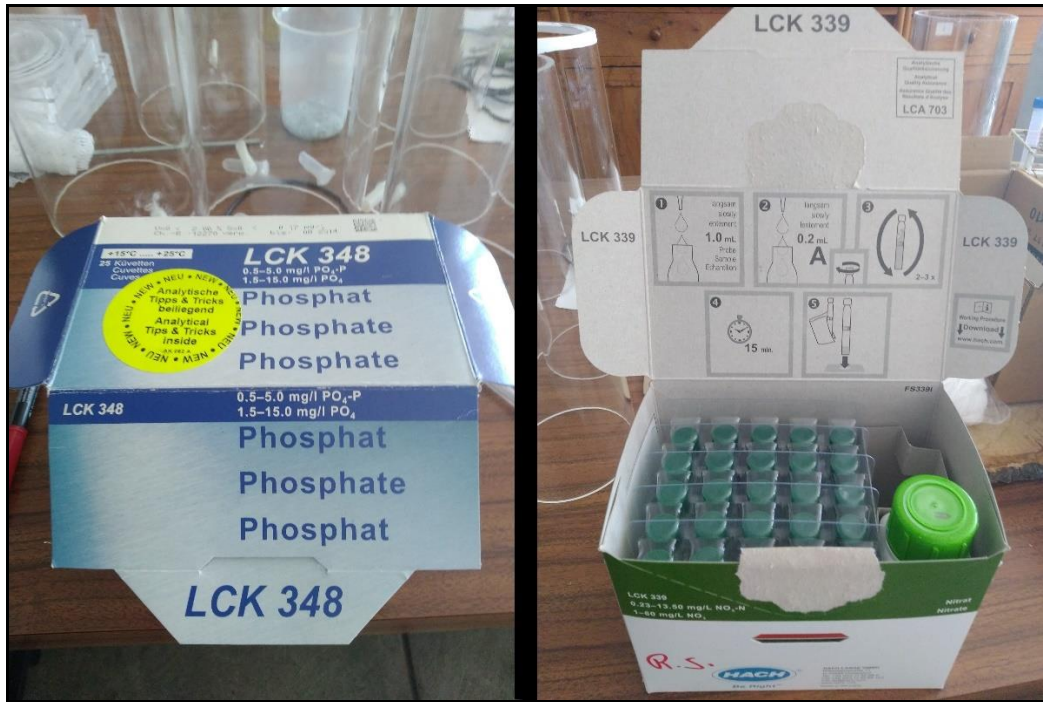


Figura 26 – Kits para análise de fosfato e nitrato, da esquerda para direita, respetivamente.



Figura 27 – Resultados do kit para fosfatos em azul e nitratos em vermelho.

### 3.2.3. Análise de matéria orgânica e outros compostos

Devido à variedade de compostos nos efluentes, foi escolhido um método que quantifica a matéria orgânica como um todo, sem individualizar compostos, a carência química de oxigénio (CQO). Para além da CQO, seguiu-se o espectro UV-visível do

efluente tratado e filtrado. Em todos os procedimentos de análise utilizou-se um branco para a comparação dos resultados.

### 3.2.3.1. Carência química de oxigênio

Um dos maiores contaminantes na maioria dos efluentes é a matéria orgânica dissolvida, algo que muitas vezes não é totalmente removido na maioria dos tratamentos convencionais. O CQO determina a quantidade de oxigênio necessário para oxidar quimicamente a matéria orgânica existente no meio, o que engloba os compostos biodegradáveis e não biodegradáveis.

Para a determinação da CQO, seguiu-se o “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”<sup>221</sup>, mais especificamente, o método de refluxo fechado e análise titrimétrica, onde 2,5mL de amostra (1,25 amostra e 1,25 de água destilada, diluição 1:2) era misturado com 1,5mL de solução digestora (dicromato de potássio) e com 3,5mL de ácido sulfúrico (ácido combinado com sulfato de prata para evitar algumas interferências) (o momento prévio de adição do ácido nas amostras é ilustrado na figura 28); esta mistura era feita em tubos próprios para digestão que eram colocados em digestores a 150°C durante 2 horas (ECO 25 Thermoreactors for COD Analysis, VELP Scientifica, Itália) (figura 29).



Figura 28 – Amostras dos cultivos filtradas, diluídas e com adição de solução digestora respetivamente.



Figura 29 – Etapa de digestão a 150°C para determinação da CQO.

Após este período (e depois de esfriar até à temperatura ambiente), o conteúdo dos tubos era passado para Erlenmeyers, adicionado 3 gotas de solução indicadora de ferroína, e colocado em titulador previamente programado e preparado para a titulação com a solução do reagente FAS (Sulfato de amônio ferroso) (Titroprocessor model 682, Metrohm, Suíça) (o equipamento é ilustrado na figura 30). O valor da CQO, em mg O<sub>2</sub>/L, determina-se através da fórmula apresentada a seguir.

$$CQO \text{ em } \frac{mgO_2}{L} = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{Amostra \text{ em mL}}$$

Onde A é a quantidade de FAS usado no ensaio em branco, B é a quantidade de FAS usada na amostra, M é a molaridade do FAS, e “8000” é o fator que tem em conta a massa-equivalente do oxigénio e a conversão de unidades (x1000mL/L). Posteriormente, tem-se em conta o fator de diluição da amostra, se for o caso.



Figura 30 – Sistema de titulação utilizado para determinação da CQO.

### **3.2.3.2. Análise UV-visível de meio filtrado**

O espectro de absorvância no UV-visível da amostra (dos 200 aos 800nm), após filtração, foi realizado no espectrofotômetro UV-visível Spectrophotometer Helios Gamma, Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos (representado na figura 31).



Figura 31 – Espectrofotômetro utilizado na etapa de análise do UV-visível.

Os resultados eram organizados e copilados pelo programa VisionPro (Thermo Scientific™ VISION pro™ UV-Visible Spectrophotometer Software), como pode ser visto na figura 32.

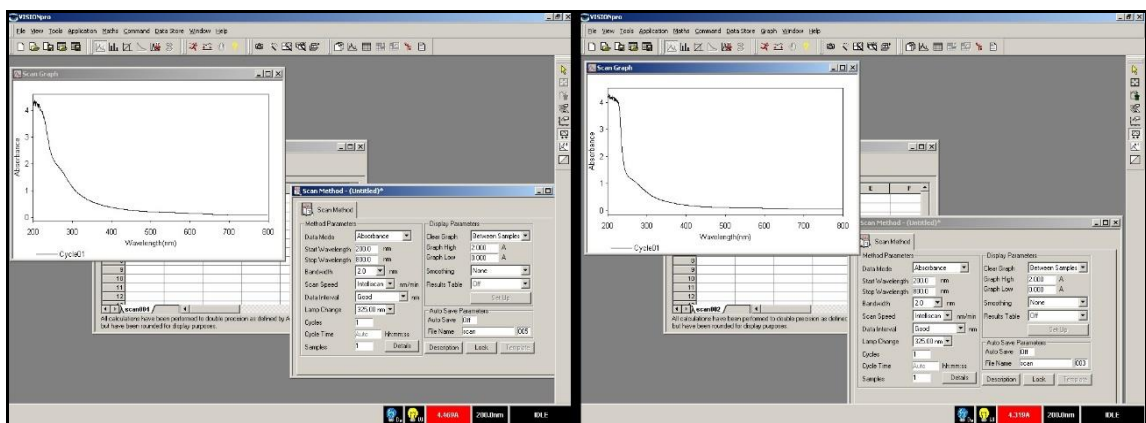


Figura 32 – Resultados de uma leitura do UV-Visível.

## 4. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se e analisam-se os resultados obtidos relativos aos seguintes tópicos:

- Resultados preliminares
- Resultados de crescimento e correspondente remoção da CQO;
- Otimização do controlo de cultivo;
- Resultados de crescimento e tratamento da CQO nos cultivos principais;
- Correlação entre os resultados e os respetivos tipos de cultivos.

### 4.1. Resultados dos ensaios preliminares

Almejando testar as capacidades de sobrevivência da microalga *Selenastrum sp.*, em efluentes industriais, foram feitos testes em pequena (150mL) e em média escala (500mL). Operando em pequena escala, apenas para testar a sobrevivência das microalgas em efluente industrial, identificou-se uma diminuição de 32% (em média) da matéria orgânica presente no efluente, após 10 dias de cultivo. Temendo a possível influência dos nutrientes contidos no inóculo inicial de microalgas quando estas são adicionados no efluente, realizou-se um segundo teste, com biomassa filtrada e sete dias de duração, apenas para observar a sobrevivência e crescimento das células. Os resultados demonstraram que o efluente da pasta para papel constitui um ambiente fortemente estressante para as algas, que se refletiu na sua mudança de pigmentação<sup>222,223</sup>, como é possível observar na figura 33 a seguir.



Figura 33 – Ensaios preliminares para sobrevivência da microalga em efluentes ( a) biomassa filtrada; b) efluente; c) algas após 7 dias no efluente).

Considerando que estes foram cultivos pequenos (100mL), de curta duração, e sem adição de nutrientes suplementares, foi preparada uma nova série de cultivos em dois reatores (duplicatas), buscando analisar o crescimento em maior escala e sob condições mais controladas.



Nesta etapa, houve uma melhor distribuição e controlo da luz ao utilizar o sistema de LEDs e o volume do reator passou para 500mL. Por outro lado, utilizou-se efluente da indústria de pasta para papel diluído e não diluído, naturalmente, um cultivo controlo para comparação de resultados.

Os resultados relativos à remoção de matéria orgânica (face à quantidade inicial), ao crescimento da biomassa (em número), pH, oxigénio dissolvido e peso seco da biomassa encontram-se nas figuras seguintes.

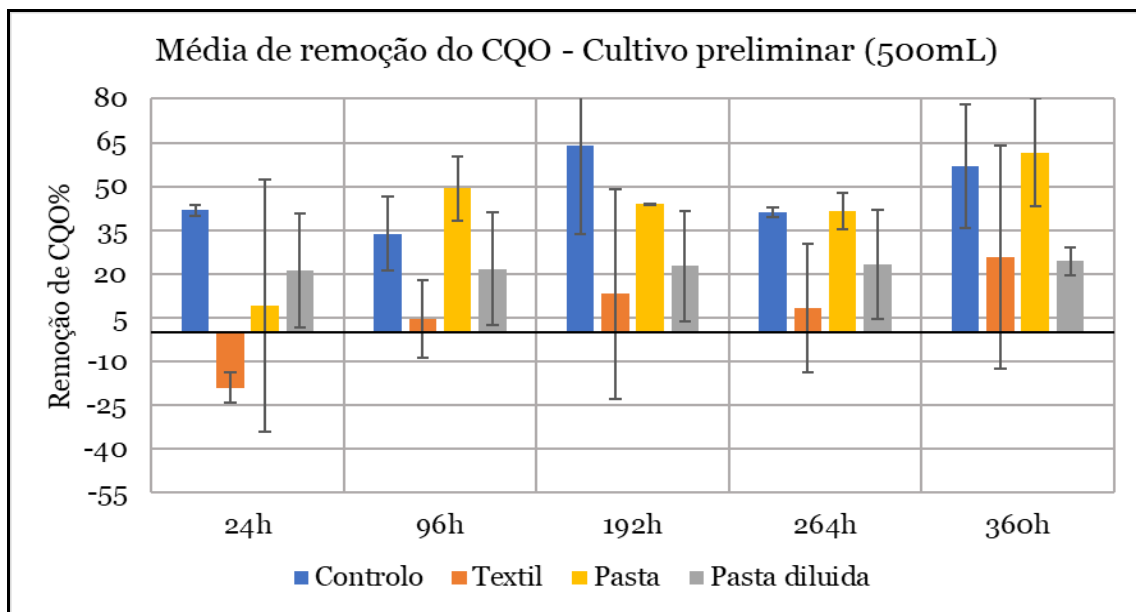


Figura 34 – Remoção da CQO, face ao valor inicial (2 horas de cultivo). Valores positivos indicam remoção e valores negativos indicam aumento na matéria orgânica.

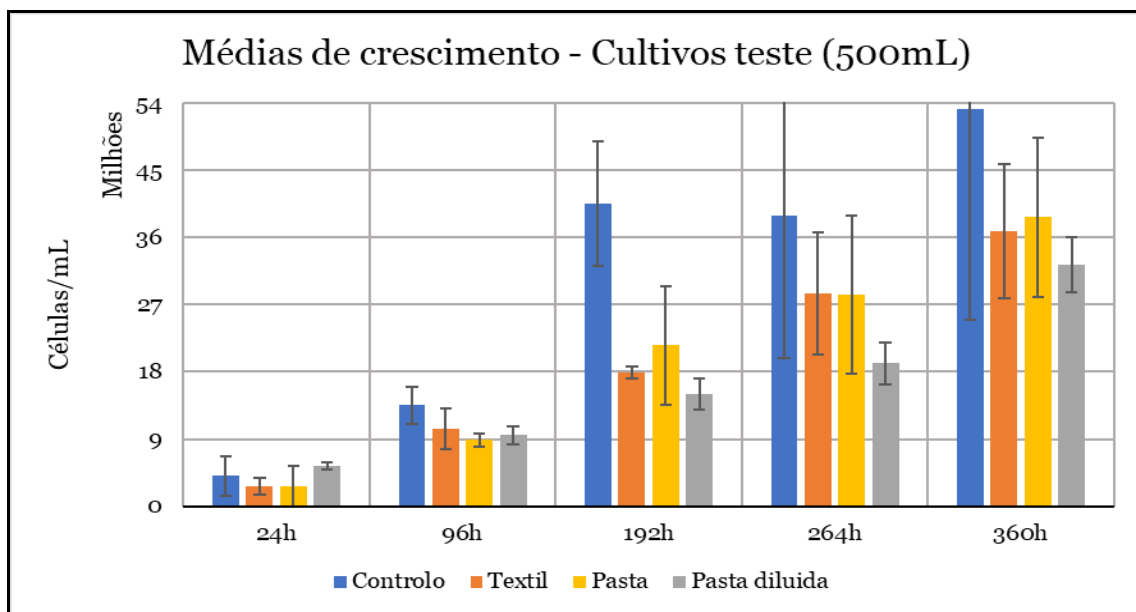


Figura 35 - Evolução temporal do número de células por mL, para o ensaio controlo, efluente têxtil, da pasta tal qual e pasta diluída.

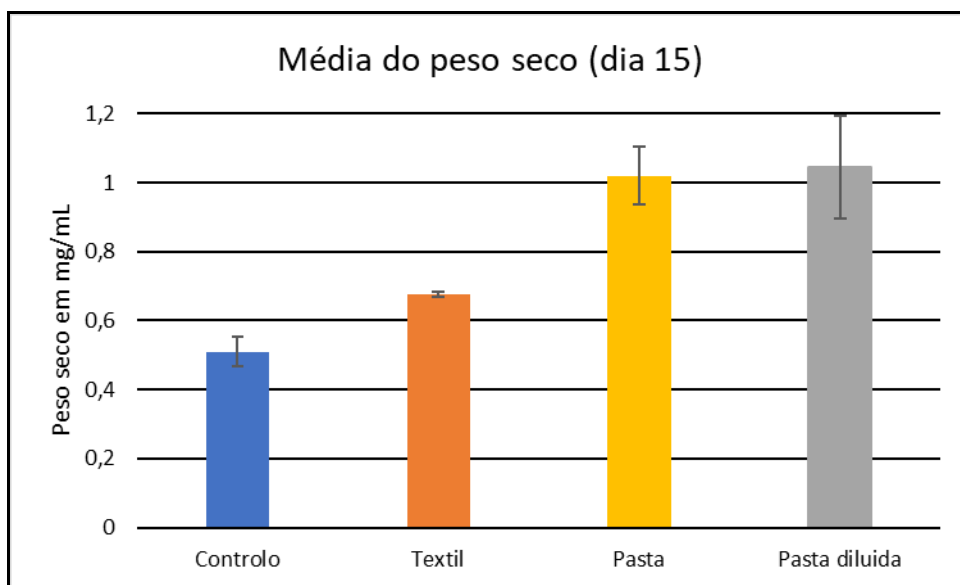
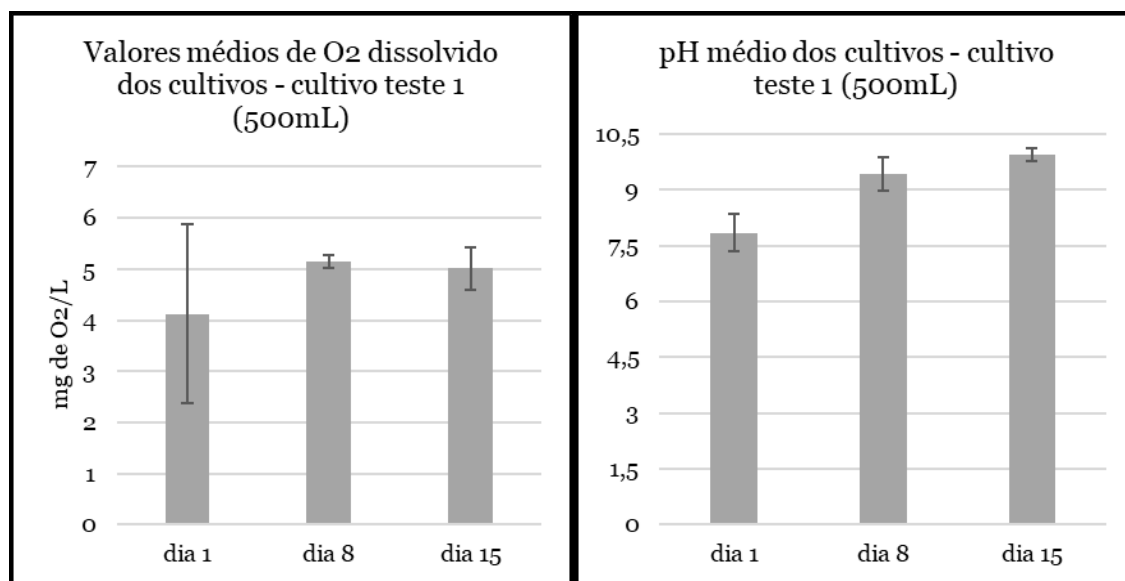


Figura 36 - Concentração mássica de biomassa algal ao cabo de 15 dias de cultivo, em diferentes efluentes e ensaio controlo (concentração inicial = 0,01 mg/mL; ensaios em duplicata).



Figuras 37 e 38 - Evolução temporal do oxigénio dissolvido e pH do meio para a média dos ensaios (medidos ao final do dia).

Como é possível observar nos gráficos apresentados, os valores de remoção da matéria orgânica revelam alguma inconsistência e até mesmo valores contrários ao que seria de esperar (aumento de matéria orgânica). De referir, no entanto, que nesta fase do trabalho e no que respeita aos valores da CQO se verificaram grandes variações entre as réplicas, provavelmente consequência de erro experimental na realização do ensaio da CQO. Contudo, observa-se um constante crescimento da biomassa (em número e massa) em todos os cultivos, onde o meio com menos estresse (controlo) obteve os

maiores valores (em números de células/mL). Ainda assim, os resultados do crescimento indicam a forte viabilidade do tratamento.

A variação da CQO dentro das réplicas de cultivos, pode ser explicada pelos vários fatores que influenciam os resultados de uma análise da CQO<sup>224-227</sup>. Por outro lado, a variação, algo inconsistente ao longo do tempo, pode ser devido à morte celular (o que resulta na libertação de matéria orgânica contida dentro das microalgas), pela libertação de exo-metabólitos<sup>228,229,230</sup> e pela contaminação do meio de cultivo por outros microrganismos. Outro fato observado foi que os primeiros 15 dias foram o suficiente para eliminar cerca de 50% da CQO inicial (considerando os melhores resultados entre as réplicas). Importante notar que os teores de oxigénio dissolvido e pH se estabilizaram rapidamente, atingindo no 8º dia uma média de 5,15 mg/L e 9,4 respetivamente. Em relação à concentração mássica de biomassa seca no dia 15º do cultivo, esta aumentou em 32,3% para o cultivo têxtil e cerca de 102,4% para o cultivo no efluente da pasta, em relação ao valor obtido no cultivo controlo. Este resultado é particularmente interessante, já que a concentração numérica de células no cultivo controlo é significativamente superior à verificada nos efluentes (Figura 35). Ou seja, enquanto no cultivo controlo houve um maior número de células, estas eram pouco densas; nos efluentes, elas multiplicaram-se menos, mas eram mais densas hipoteticamente devido à maior acumulação de compostos. Esta acumulação de biomassa é um resultado interessante, visto que viabiliza uma possível reutilização da biomassa para outras finalidades, como a produção de biodiesel através de seus lipídeos.

Durante os cultivos preliminares, percebeu-se a presença de outras duas espécies de microalgas (apresentadas nas figuras 39 e 40) e de vários tipos de bactérias (apresentado na figura 41), contudo, estes só demonstram uma presença relevante ao final dos cultivos.



Figuras 39 e 40 – Outras espécies de microalgas encontradas durante o cultivo.



Figura 41 – Bactérias registadas durante o cultivo.

Não foi possível determinar a espécie, origem e o grau de influência nos resultados, contudo, ainda é interessante permitir a existência de tais microrganismos pelo fato de que as metodologias para tratamento de efluentes com microalgas sempre terão uma influência de microrganismos, além da alga selecionada para tratamento, seja de invasores de fora do cultivo ou dos contidos nos efluentes. Assim, mais do que prevenir ou eliminá-los, é necessário adaptar os procedimentos tendo em conta estes fatores.

No caso deste projeto, como os microrganismos passam a ter uma presença mais efetiva ao final dos cultivos (provavelmente porque a microalga *Selenastrum sp.* deixou o cultivo com efluentes mais adequado para outros organismos) e o tratamento para matérias orgânicas aparenta atingir o seu máximo nos primeiros 8 dias, a principal forma de evitar este problema é garantir um crescimento e desenvolvimento da *Selenastrum sp.* o mais rápido possível.

## **4.2. Resultados do desenvolvimento da biomassa nos ensaios principais**

Ao fazer a reavaliação dos métodos seguidos nos ensaios preliminares, nomeadamente a inconsistência de alguns resultados da CQO, realizou-se uma nova série de ensaios (figura 42) nas seguintes condições:

- Preservar o método de controlo da intensidade luminosa e sua duração;
- Preservar o método de controlo da temperatura;
- Preservar o método de controlo do fluxo de ar;
- Utilização de um novo meio de nutrientes (GM-FWS) devidamente esterilizado, tanto para cultivos controlo quanto para os com efluentes;
- Uma menor duração do cultivo (foi possível obter resultados interessantes em 8 dias e evita-se alguma morte celular e o eventual aparecimento de outros microrganismos contaminantes);
- Sonicação de baixa intensidade, separação e lavagem das microalgas que serão introduzidas no cultivo (inóculo), para evitar a influência dos compostos eventualmente adsorvidos no exterior das células, bem como dos compostos existentes no meio de cultura original (figura 43);
- Fazer a monitorização dos filtrados das amostras tomadas ao longo do ciclo de crescimento por leitura do UV-visível (de 200 à 800nm) e comparar com a evolução correspondente da CQO;
- Não controlar o pH do cultivo visto que esta alga cresce bem em pH alcalino (e também que o pH alcalino auxilia na prevenção de contaminações)<sup>231,232</sup>.



Figura 42 – Ensaio definitivos de microalgas em efluentes (C: controlo; T: têxtil; P: pasta para papel).



Figura 43 – Procedimentos de filtração, diluição, preparo para contagem e sonicação.

Além destas questões, seria necessário comprovar que as microalgas estão consumindo toda a matéria orgânica biodegradável; para tal, foi feito um cultivo com uma adição de 500mg de glucose, o que representa 600 mg da CQO/L de matéria orgânica (tal cultivo pode ser visto na figura 44).



Figura 44 – Ensaios definitivos de microalgas, réplicas e cultivo com glucose (G).

Em todos os cultivos definitivos houve um crescimento da população de *Selenastrum sp.* sem a presença significativa de outros microrganismos. As seções seguintes apresentam os resultados para o desenvolvimento da biomassa e sua acumulação nas microalgas no período de 192 horas de cultivo em meio controle, efluente têxtil, efluente da pasta para papel e meio controle com adição de glucose.

#### **4.2.1. Biomassa nos cultivos controle**

Tal como nos ensaios preliminares, os cultivos controle foram os que desenvolveram um maior número de células por mL, alcançando uma média de 10 milhões de células por mL em 192 horas. Estes valores são inferiores aos verificados nos ensaios preliminares provavelmente devido à menor concentração inicial de células no inóculo. Em relação ao acúmulo de biomassa, este atingiu cerca de 0,3 mg de biomassa para cada mL de cultivo ao cabo dos 8 dias. Em comparação com outros trabalhos que utilizaram o mesmo gênero de microalga em condições controladas, Chakravarty & Mallick em 2019<sup>235</sup> alcançou 0,5mg/mL de biomassa seca (9 dias) e Marika et al., em 2018<sup>236</sup> obteve um máximo de 6,2 milhões de células por mL (15 dias de cultivo). Estas diferenças de valores, apesar de serem pouco expressivas, podem ser causadas por diferentes parâmetros de cultivo e volume inicial de inóculo em cada trabalho. A figura 45 apresenta a evolução da concentração de células e de biomassa para o ensaio controle, i.e., sem efluente.

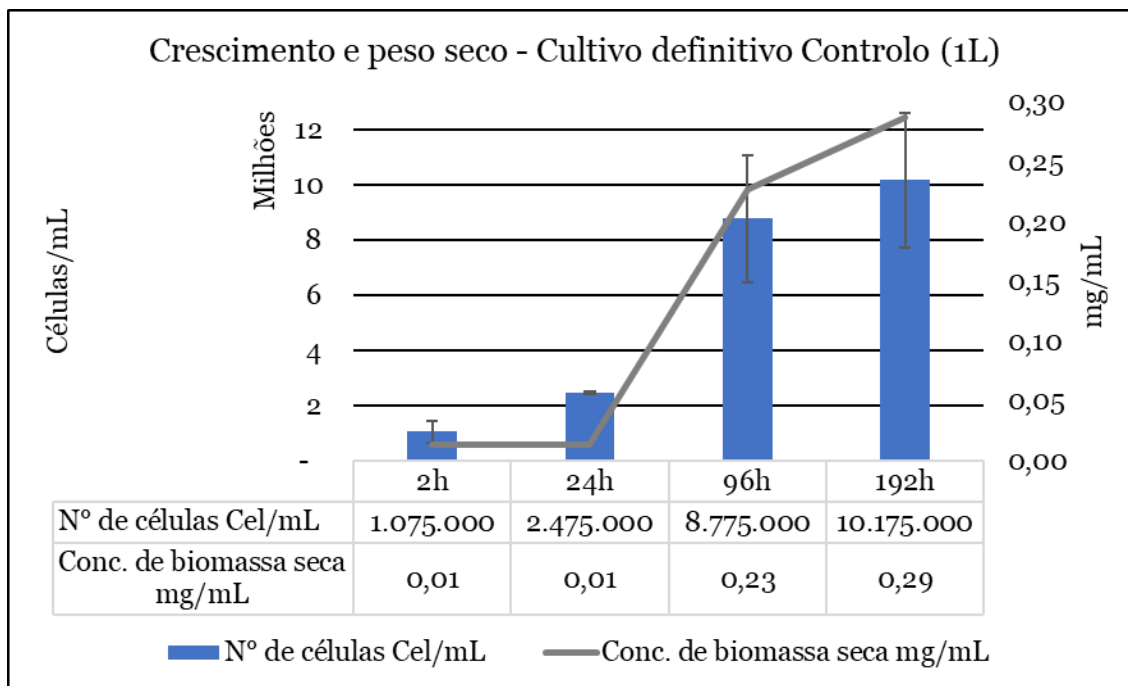


Figura 45 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio controlo.

Por outro lado, observa-se um aumento muito significativo do tamanho das microalgas, como se pode comprovar pela comparação de suas dimensões no início do cultivo (figura 46) e ao final (figura 47).

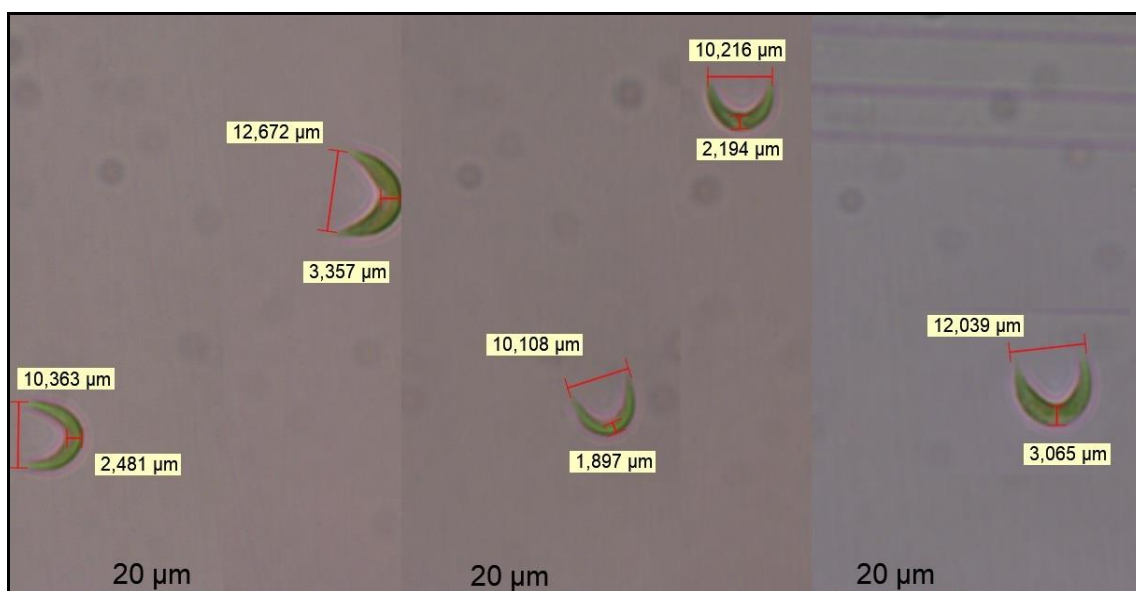


Figura 46 - Dimensões das microalgas no início do ensaio controlo.



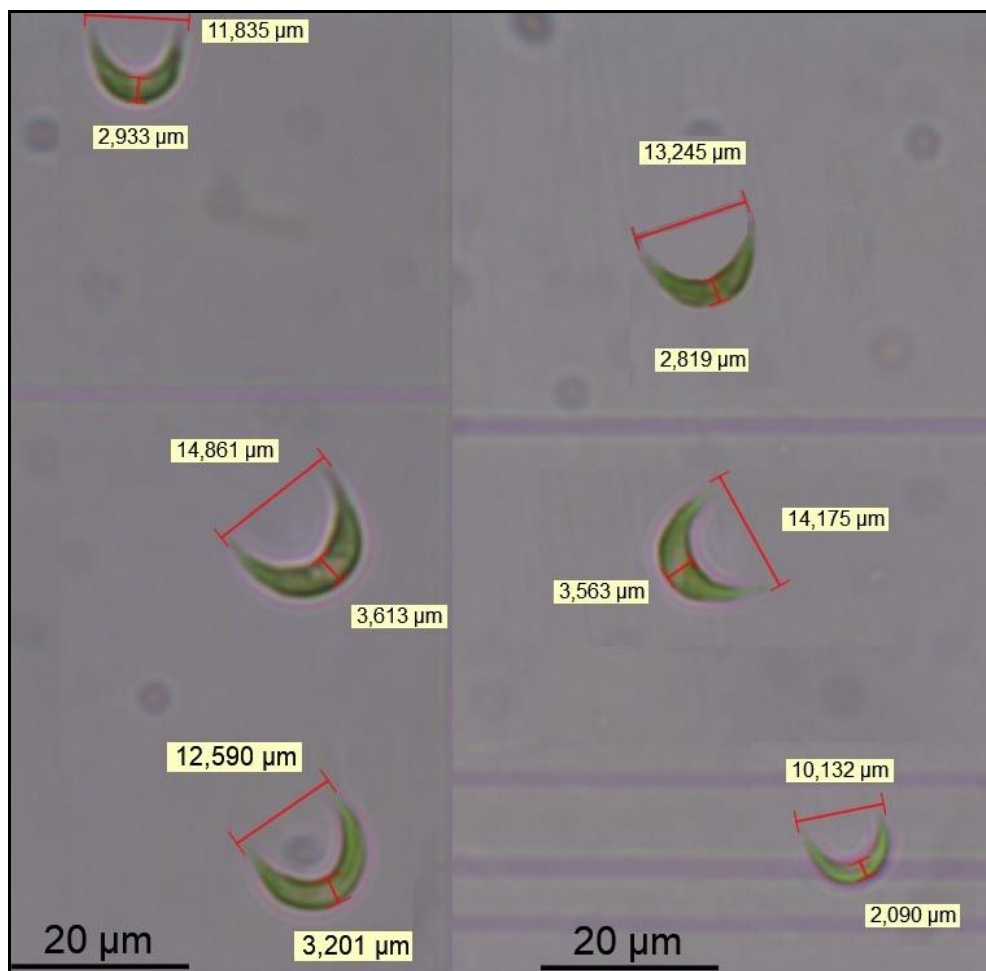


Figura 47 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio controlelo.

Ao estimar o volume médio das células, encontrou-se os valores de  $82,01 \mu\text{m}^3$  para o início do ensaio e  $108,24 \mu\text{m}^3$  no final, o que representa um aumento de 31,98%, similar ao crescimento do volume celular observado por Cabanelas et al. (2016)<sup>237</sup>, para a microalga *Chlorococcum littorale* em 5 dias de cultivo controlado.

#### 4.2.2. Biomassa nos cultivos de efluente têxtil

O cultivo realizado em efluente têxtil (Figura 48), resultou muito bem, ainda que o meio possa ser algo estressante, devido aos compostos dissolvidos e à presença de cor (pigmentos e/ou corantes) que dificultaram a fotossíntese. Apesar deste estresse, a microalga cresceu bem e tornou-se dominante no meio, demonstrando a sua capacidade e tolerância a efluentes da indústria têxtil (figura 48). Estes resultados de crescimento se assemelham ao de Lim et al., em 2010<sup>215</sup> com 8 milhões Cel/mL em um cultivo em efluente não diluído (10 dias) e maior do que reportado por El-Kassas & Mohamed em 2014<sup>219</sup>, com 220.000 Cel/mL em efluente têxtil diluído (30%) (8 dias), ambos utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*.

Dentre os efluentes, o da indústria têxtil foi o que apresentou melhores valores de crescimento em número, com valores próximos a 9 milhões de células por mL no final do cultivo, apenas ligeiramente inferior ao controlo. No entanto a massa de microalgas acumulada é cerca de 46,5% maior, face ao controlo, uma produção de 0,0525 g/L.dia, maior que do que o observado em outros trabalhos com cultivos de microalgas em efluentes têxteis como é citado na revisão feita por Fazal et al. (2018)<sup>218</sup>. A figura 48 apresenta a evolução da concentração de células e de biomassa para o ensaio com o efluente têxtil.

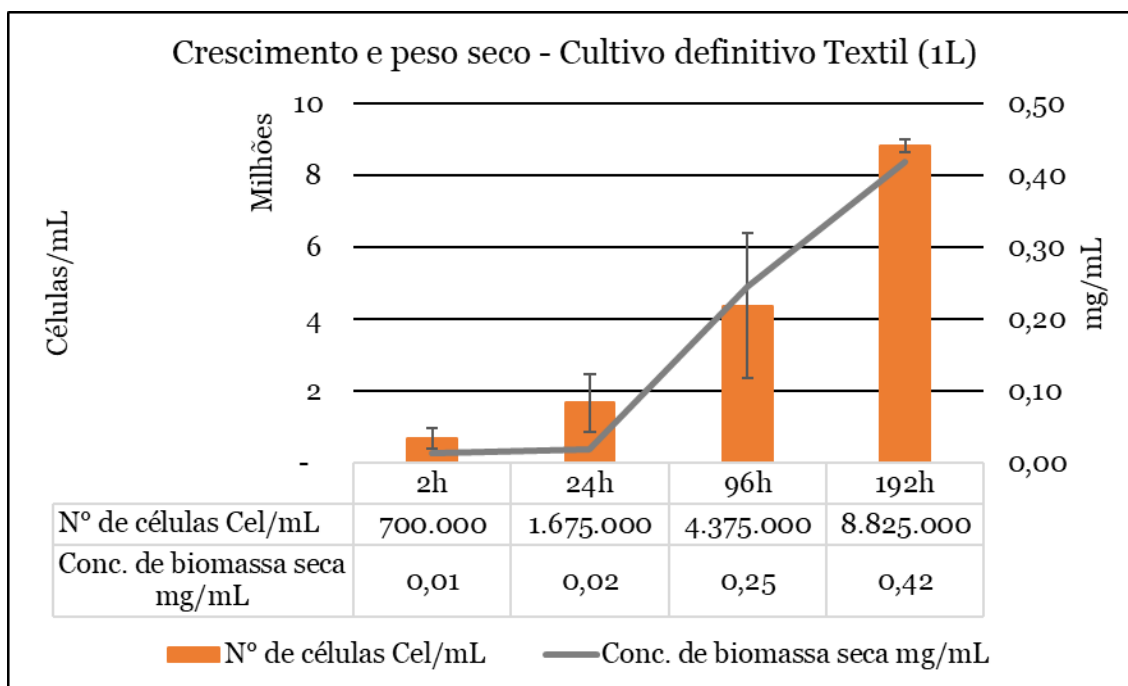


Figura 48 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio com efluente têxtil.

De facto, este efluente gera células expressivamente maiores, como se pode observar nas figuras 49 e 50.

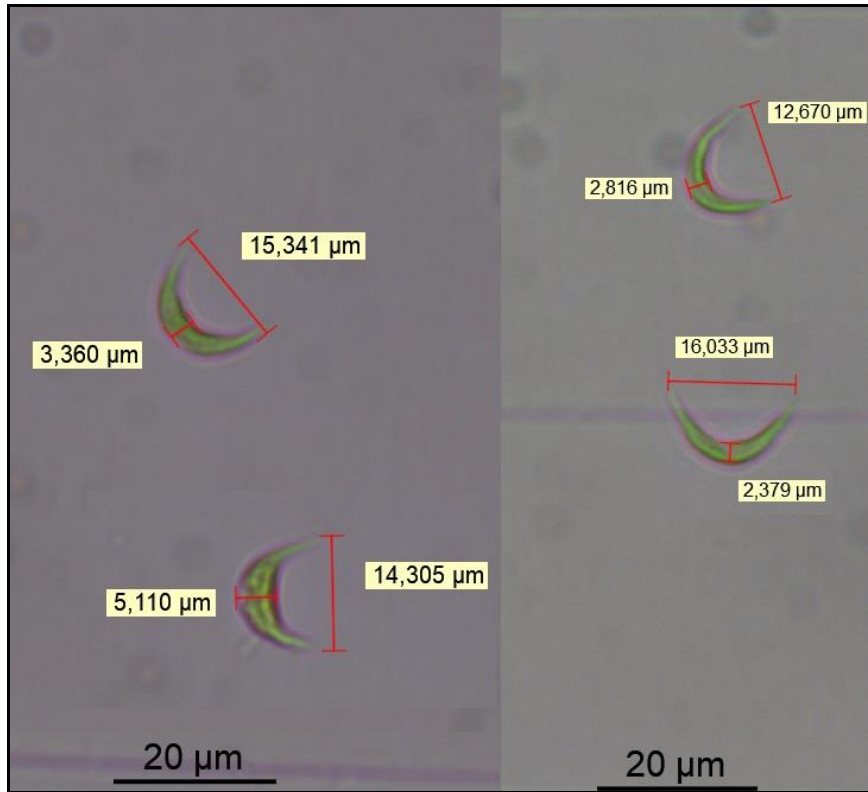


Figura 49 - Dimensões das microalgas no início do ensaio no efluente têxtil.

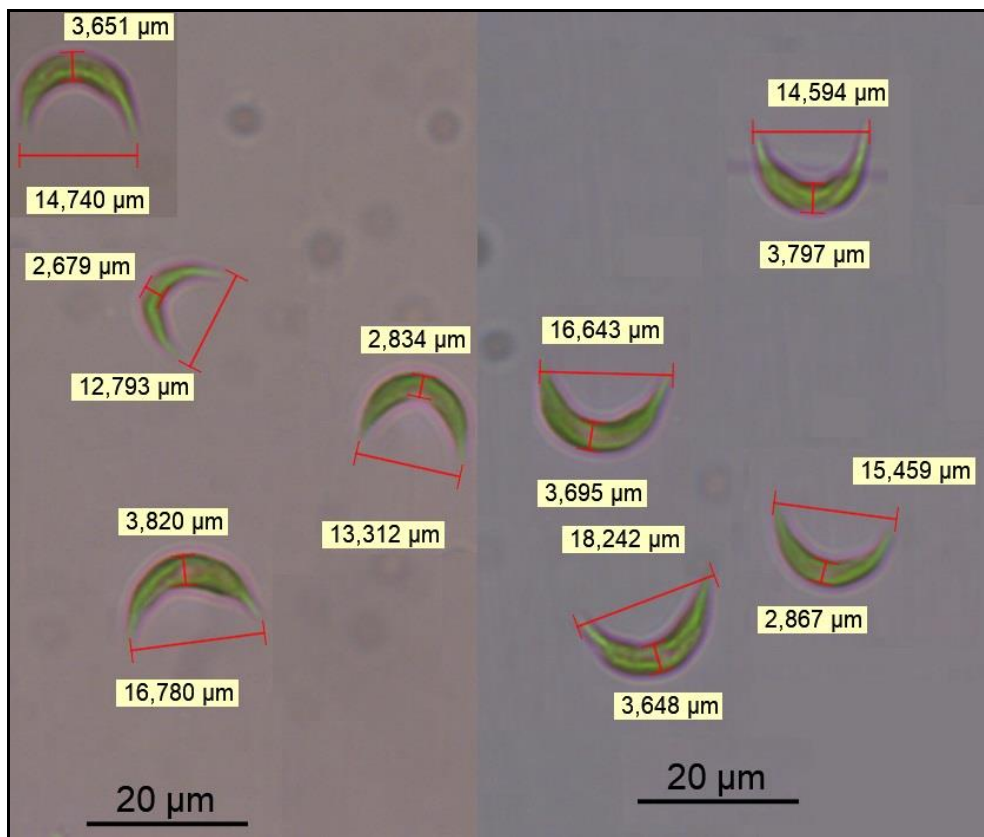


Figura 50 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio no efluente têxtil.

As microalgas que cresceram em efluente têxtil, apesar de maiores em média que o controlo, 123,18  $\mu\text{m}^3$  no início e 149,05  $\mu\text{m}^3$  no final, obtiveram um menor aumento, sendo ele de 21%.

#### **4.2.3. Biomassa nos cultivos de efluente da pasta para papel**

Devido às suas propriedades redutoras e possivelmente à presença de compostos agressivos para as microalgas, o efluente da pasta para papel (figura 51) foi o que mais causou estresse no cultivo de *Selenastrum sp.*, resultando num crescimento inferior face ao controlo, mas possivelmente com acumulação de compostos (possivelmente lipídeos), visto que esta é a principal estratégia das microalgas ao encontrar dificuldades para realizar a divisão celular. A mesma diferença pode ser observada ao comparar 2 trabalhos que cultivaram *Chlorella vulgaris* no tratamento de efluentes, sendo que houve um maior crescimento em efluente têxtil<sup>215</sup> do que em efluente da pasta para papel<sup>206</sup> no mesmo período de tempo.

Em linha com o verificado nos ensaios preliminares, o crescimento em termos do número de células no efluente da pasta para papel é o que proporciona menores valores de biomassa, neste caso atingindo 6 milhões de células por mL. Por outro lado, e também consistente com os resultados preliminares, é o que acumula maior massa de microalgas, com mais 62,8% que as do cultivo controlo. Ainda assim, um valor (0,0585mg/L.dia), menor que o observado para a microalga *Scenedesmus sp.* por Gentili (2014)<sup>205</sup> que obteve 0,1mg/L.dia; contudo, neste trabalho havia uma mistura de efluente da pasta para papel e efluente da indústria leiteira, o que poderia significar um maior teor de nutrientes dissolvidos, logo uma maior oportunidade de acúmulo de biomassa. As figuras 52 e 53 ilustram as suas dimensões no início e fim do cultivo respetivamente.

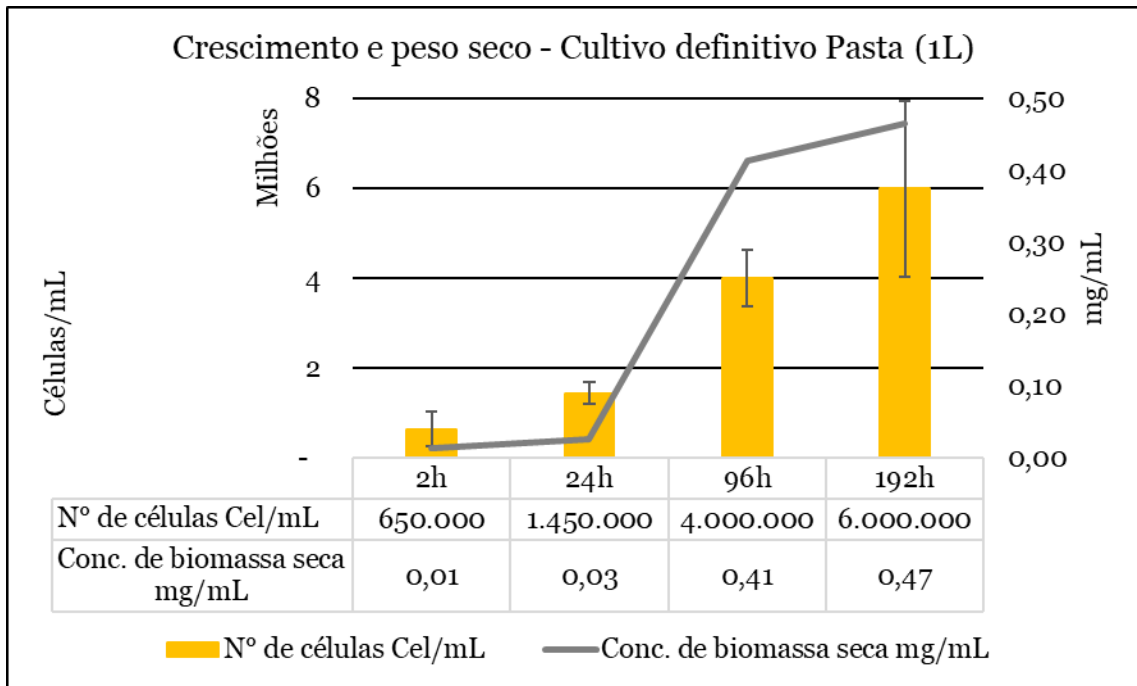


Figura 51 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio com efluente da pasta para papel.

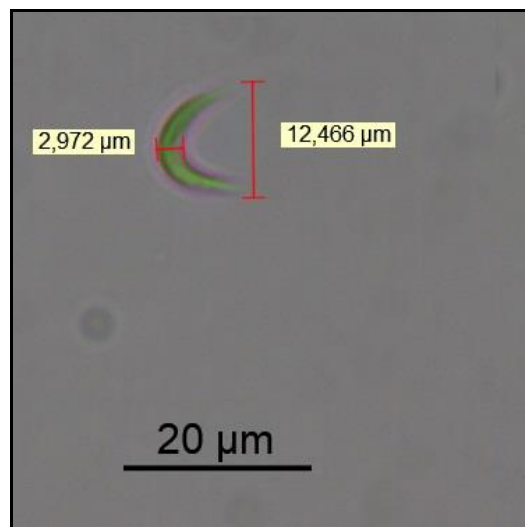


Figura 52 - Dimensões das microalgas no início do ensaio no efluente da pasta para papel.

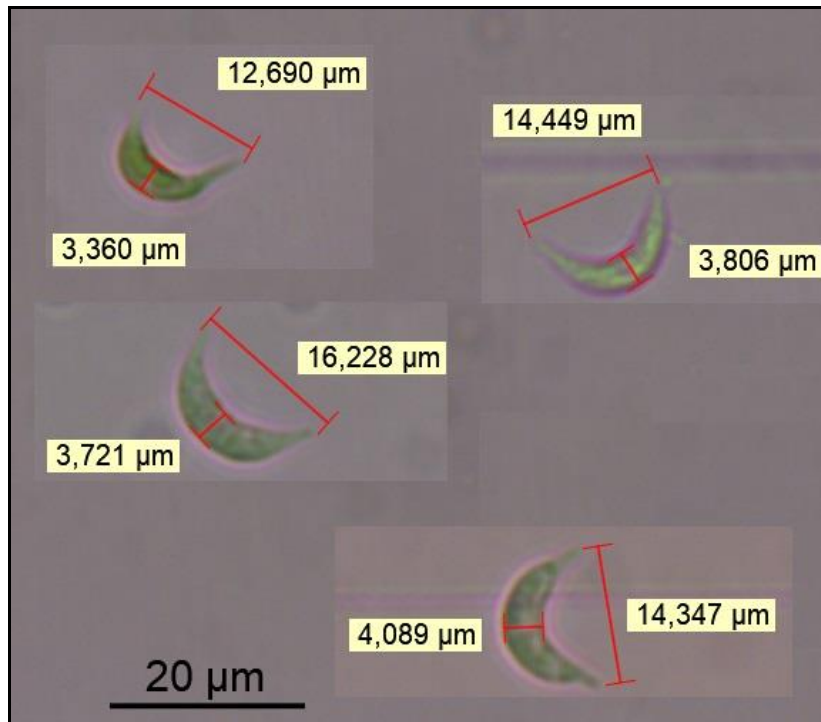


Figura 53 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio no efluente da pasta para papel.

Os cultivos que cresceram no efluente da pasta para papel foram os que alcançaram os maiores volumes e um aumento mais expressivo em relação ao seu volume inicial, sendo eles  $115,09 \mu\text{m}^3$  no início e  $167,82 \mu\text{m}^3$  no fim, resultando em um aumento de 45,8%.

#### 4.2.4. Biomassa nos cultivos com Glucose

Como se pode observar na figura 54, o crescimento no meio controle com adição de glucose foi o que demonstrou os melhores resultados de todos os cultivos; obteve 14,5 milhões de células por mL e um peso seco 76.7% maior que o controle sem glucose, o maior aumento em todos os cultivos. As figuras 55 e 56 representam as dimensões das células no início e final do cultivo respectivamente. Em relação ao seu volume, inicialmente as células possuíam em média  $127,60 \mu\text{m}^3$  e no final  $201,24 \mu\text{m}^3$ , resultando em 57,7% de aumento. Elevados incrementos aos valores de massa e volume celular, também foram verificados por Chioccioli et al., em 2014<sup>238</sup>, para as microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e *Chlorella vulgaris*, após adição de glucose ao cultivo.

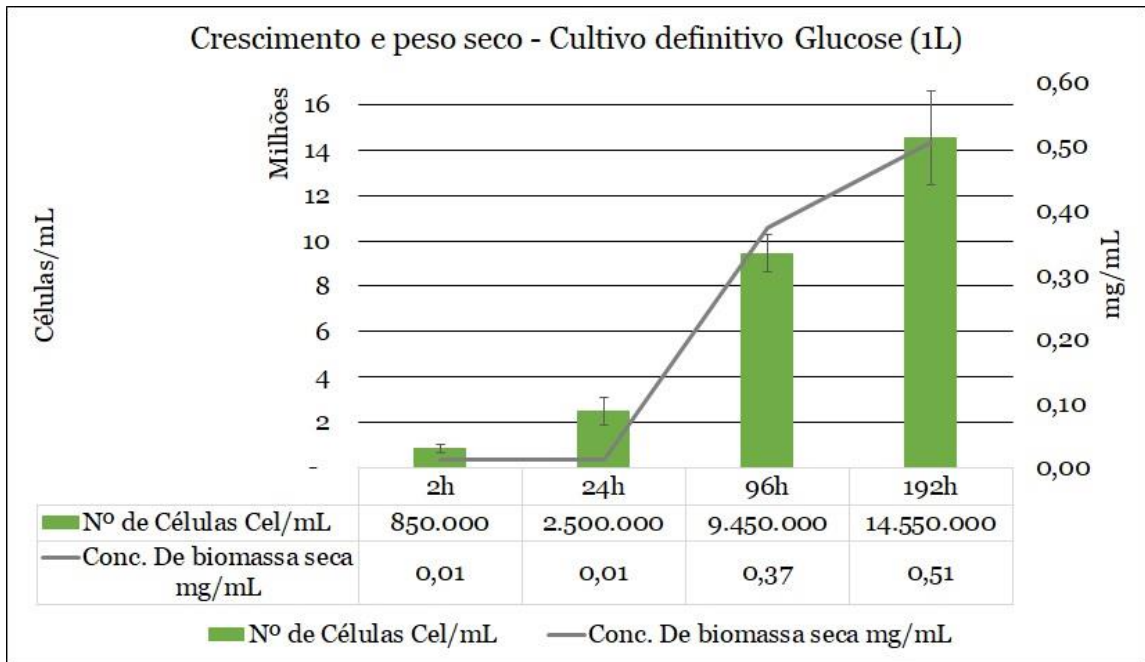


Figura 54 - Evolução temporal do número de células por mL e da biomassa em mg/mL, para o ensaio controlo com adição de glucose.

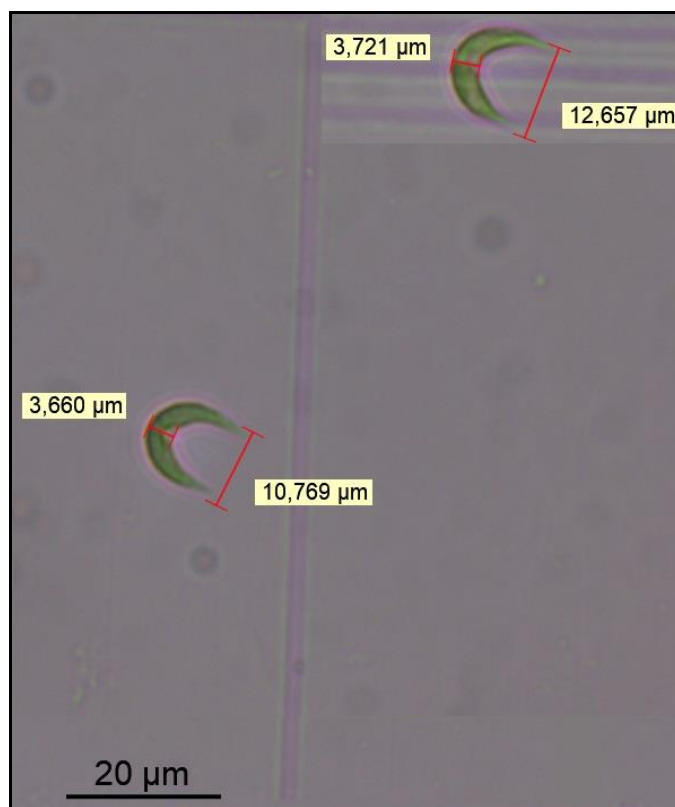


Figura 55 - Dimensões das microalgas no início do ensaio controlo com glucose.

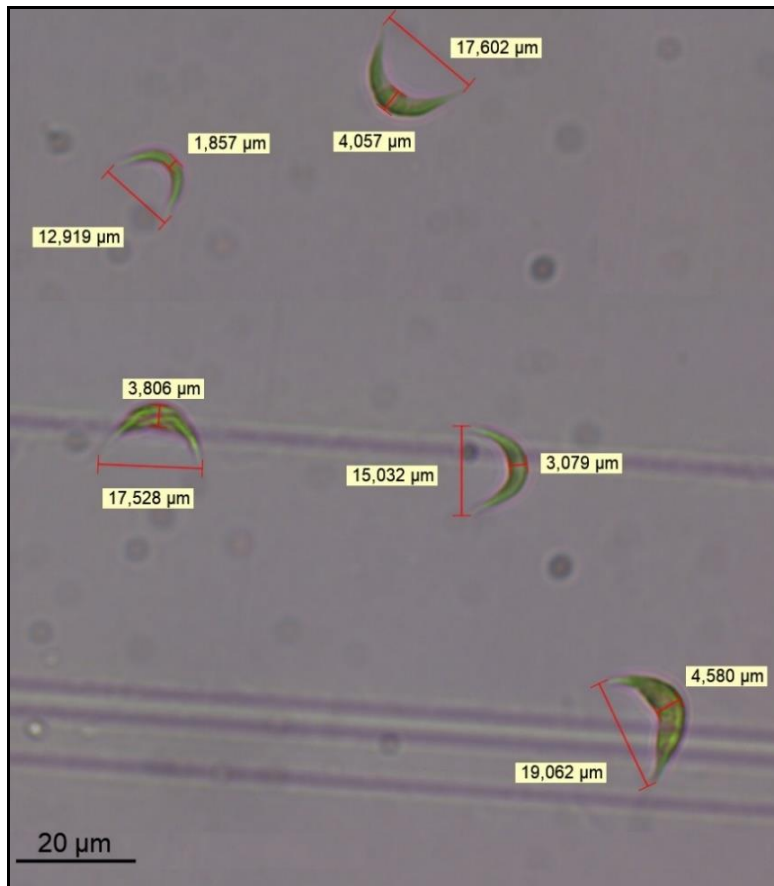


Figura 56 - Dimensões das microalgas no fim do ensaio controlo com glucose.

Os resultados obtidos no cultivo com glucose demonstram a capacidade da microalga para remover matéria orgânica biodegradável além de ser uma das várias possibilidades para aumentar a eficácia dos cultivos de *Selenastrum sp.*, onde um cultivo controlado, com poucos ou nenhum fator estressante, com abundância de matéria orgânica de fácil assimilação e transformação, podem melhorar todo o sistema de cultivo.

#### 4.2.5. Comparação do crescimento de biomassa nos diferentes cultivos

Nas próximas figuras 57 e 58, é feita uma comparação dos perfis temporais do crescimento da biomassa, em número de células, e em massa (base seca) dos cultivos com diferentes meios, incluindo efluentes e glucose. Em primeiro lugar, cumpre observar que o comportamento em termos do número de células é bastante diferente do correspondente comportamento em termos de massa. O incremento em termos de número de células é bastante menor em quaisquer dos efluentes (têxtil e papel), face ao controlo e ao cultivo com adição de glucose. Relativamente à análise com base na massa, o efluente da pasta acompanha relativamente bem o meio com glucose, o que



demonstra o potencial do efluente. Em termos de biomassa gerada, o ensaio controle é o que apresenta os menores valores. Conjugando os resultados do número de células e da massa das células, o ensaio com adição de glucose é o que apresenta o melhor desempenho. Uma possível explicação para este desempenho pode ser o meio de cultivo extremamente rico em nutrientes, incluindo a glucose como fonte de carbono, bem como o meio não estressante.

Interessante observar também que quanto mais controlado e menos estressante o ambiente, maior é o número de células, enquanto os ambientes mais estressantes ou com maior teor da CQO determinam uma maior biomassa seca.

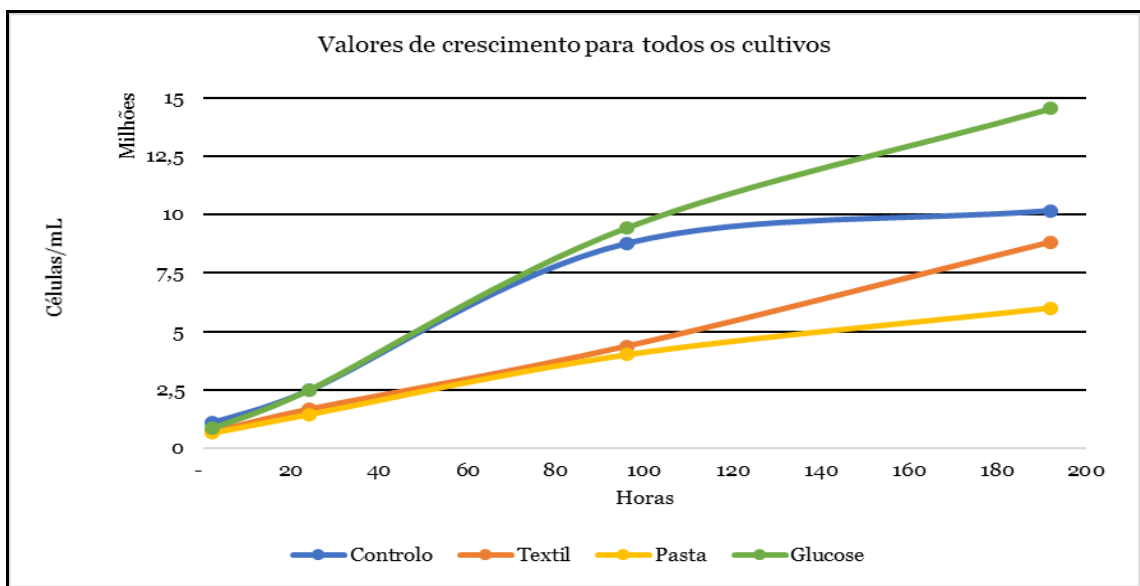


Figura 57 - Comparação do crescimento de *Selenastrum sp.* nos diferentes cultivos, em escala linear.

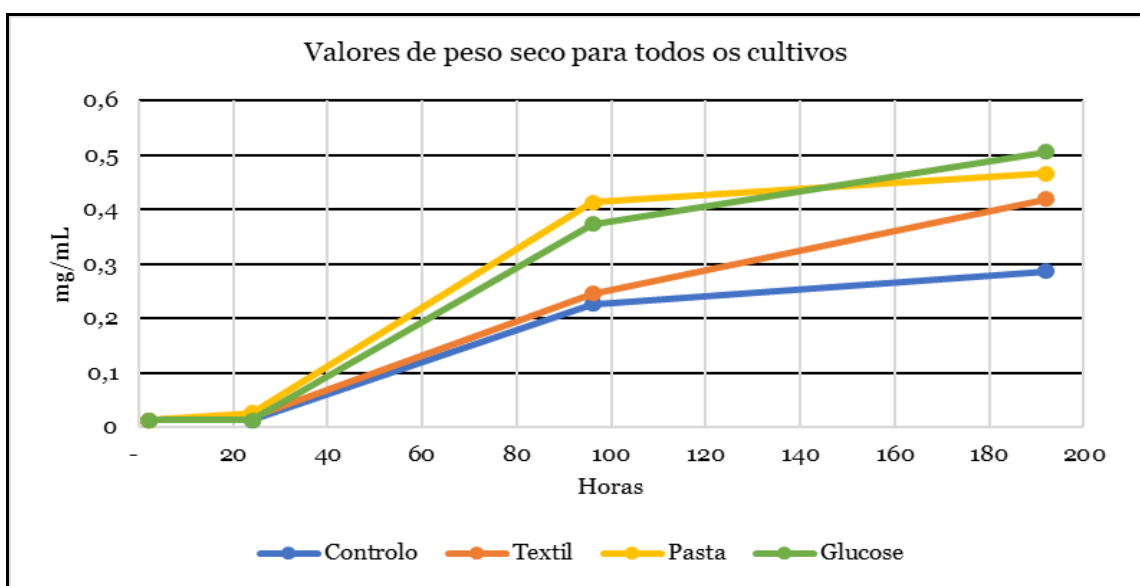


Figura 58 - Comparação do incremento de biomassa seca de *Selenastrum sp.* nos diferentes cultivos, em escala linear.

Analisando o conjunto dos resultados, incluindo os efluentes e os controlos, pode concluir-se que a quantidade de biomassa algal seca produzida no efluente da pasta para papel e no controlo com glucose são similares, o que mostra o potencial do efluente para o cultivo da microalga.

Com base nos dados das figuras 57 e 58, estimou-se a massa de cada célula (Figura 59). Como se pode observar, os diferentes meios geram células com massas bastante diferentes. O ensaio controlo, sem fonte carbono adicional, é aquele que gera as células de menor massa e de menores dimensões. De entre os meios com fonte de carbono adicional (glucose e efluentes), o efluente proveniente do processo de produção de pasta para papel é aquele que gera as células com maior massa, contudo as maiores dimensões ficaram para os que crescerem com glucose. Autores como Daneshvar et al. (2021)<sup>140</sup>, Ananthi et al. (2021)<sup>125</sup> e Chioccioli et al. (2014)<sup>247</sup>, reportaram aumento na biomassa algal quando cultivadas em efluentes, cultivadas em condições abióticas estressantes e em cultivos controlo com adição de glucose respetivamente.

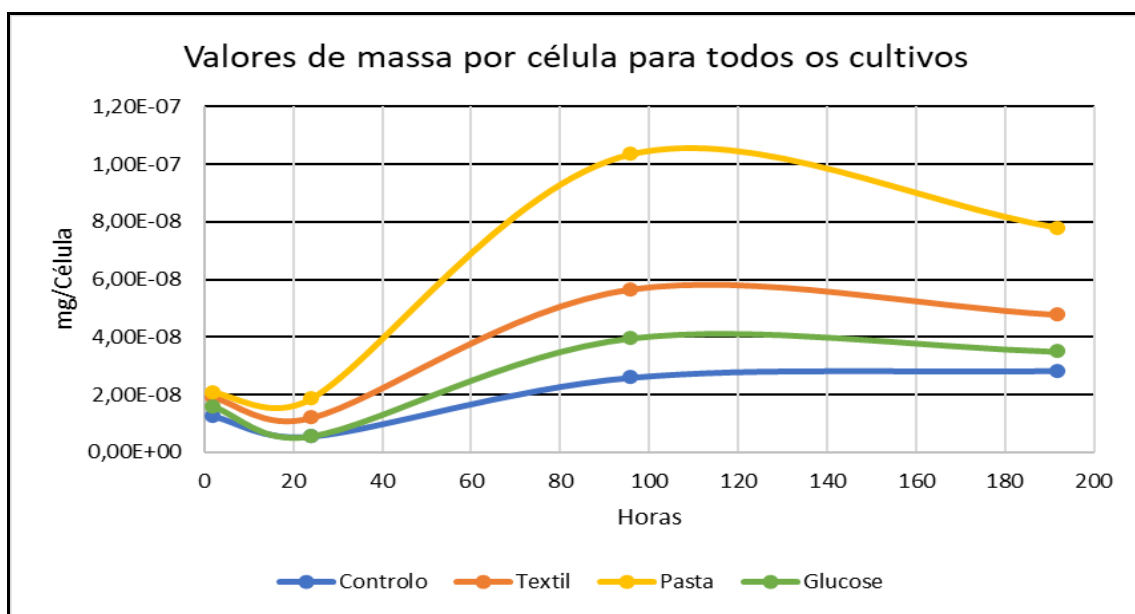


Figura 59 - Comparação entre o aumento da massa celular de *Selenastrum sp.* nos diferentes cultivos em escala linear.

### 4.3. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível

Sendo um dos intuitos deste trabalho o tratamento de efluentes utilizando a microalga *Selenastrum sp.*, era essencial monitorizar o CQO. Ultrapassadas algumas dificuldades analíticas nos ensaios preliminares, foi possível obter resultados fiáveis e consistentes. As leituras no UV-Visível foram de vital importância para comprovar a diminuição de

compostos dissolvidos no meio, demonstrando a capacidade das microalgas de absorverem tanto nutrientes quanto outras moléculas presentes no ensaio.

#### 4.3.1. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível na biomassa controle

Na figura 60 está representada a evolução da CQO e da integral da absorção do filtrado para o cultivo controle. Como era esperado, o cultivo controle foi o que apresentou o menor teor de matéria orgânica dissolvida; esta advém das próprias microalgas e do meio que as continha (visto que o meio de cultura GM-FWS apenas possui compostos inorgânicos e CQO de 8,5mgO<sub>2</sub>/L). A linha que representa as leituras no UV-Visível acompanha a diminuição de compostos conforme a biomassa se multiplica, representando o seu consumo. O pequeno aumento nos níveis da CQO ao final do experimento, às 192 horas, está dentro do erro esperado para este tipo de análise.

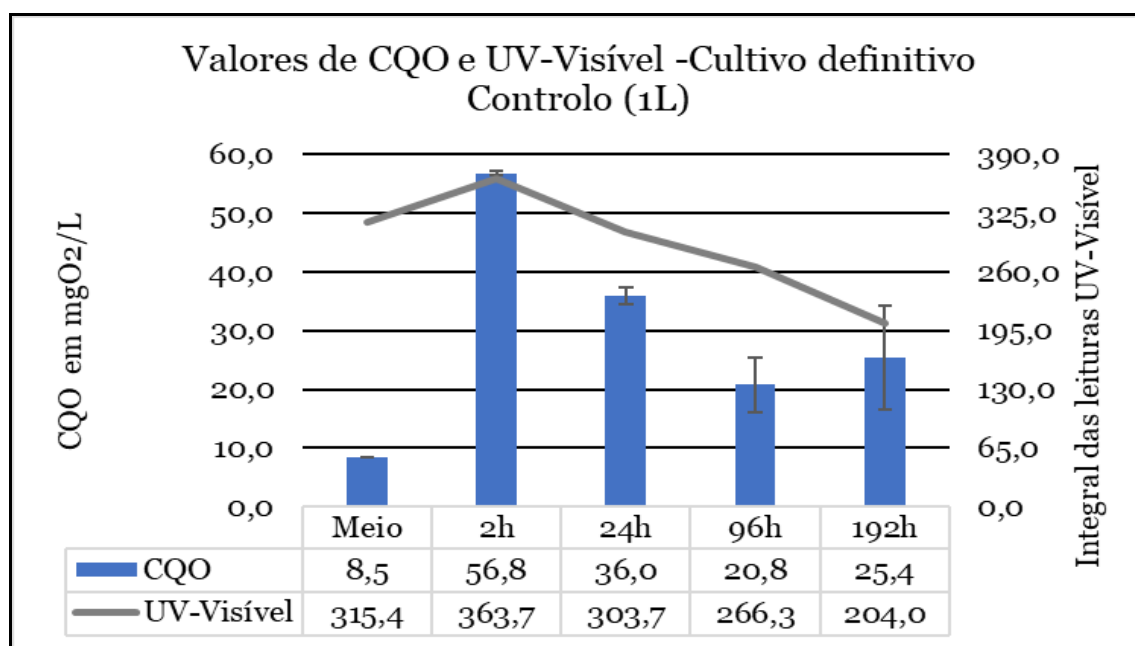


Figura 60 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos controles.

#### 4.3.2. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no efluente têxtil

Na figura 61 está representada a evolução da CQO e da integral da absorção do filtrado para o cultivo em efluente têxtil. Os níveis da CQO para o cultivo em efluente têxtil teve um ritmo decrescente e muito significativo, reduzindo em 49,2% os teores da CQO presentes no efluente. Este resultado se assemelha com a média de remoção (50,3%) de dois cultivos (com e sem adição de nutrientes standard) realizados por Lim et al. em

2010<sup>215</sup> os quais duraram 12 dias. Em relação a absorção integrada (200 a 800nm), esta reduziu em 33,7%.

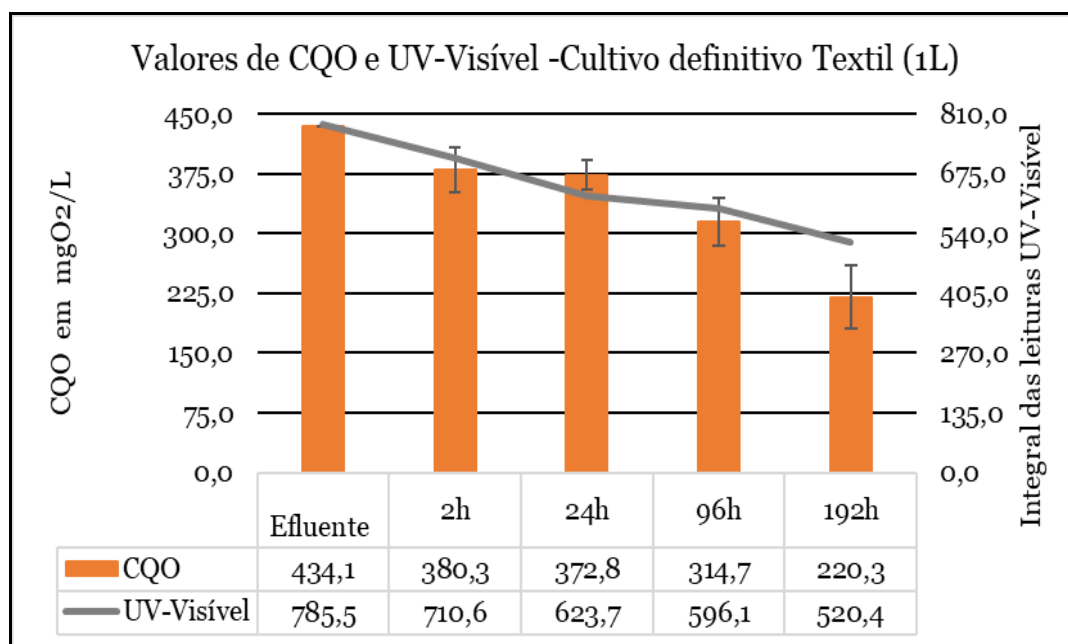


Figura 61 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos com efluente têxtil.

#### 4.3.3. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no efluente da pasta para papel

Tal como na biomassa acumulada por mL, o cultivo no efluente da pasta (figura 62) obteve os melhores valores face ao cultivo no efluente têxtil, sendo o que apresenta a maior diminuição da CQO, com uma redução de 64,3%. Este valor compara bem com os valores reportados noutros trabalhos com cultivos de microalgas em efluentes da indústria do papel, os quais obtiveram uma remoção de 39% em cultivos de *Scenedesmus acuminatus* em efluentes da pasta para papel digeridos anaerobicamente<sup>123</sup> e 75% para cultivos com duas espécies de *Scenedesmus* em um cultivo com concentração de 60% de efluente<sup>206</sup>. Já para a absorbância integrada (200 a 800nm), houve uma diminuição de 31,7%.

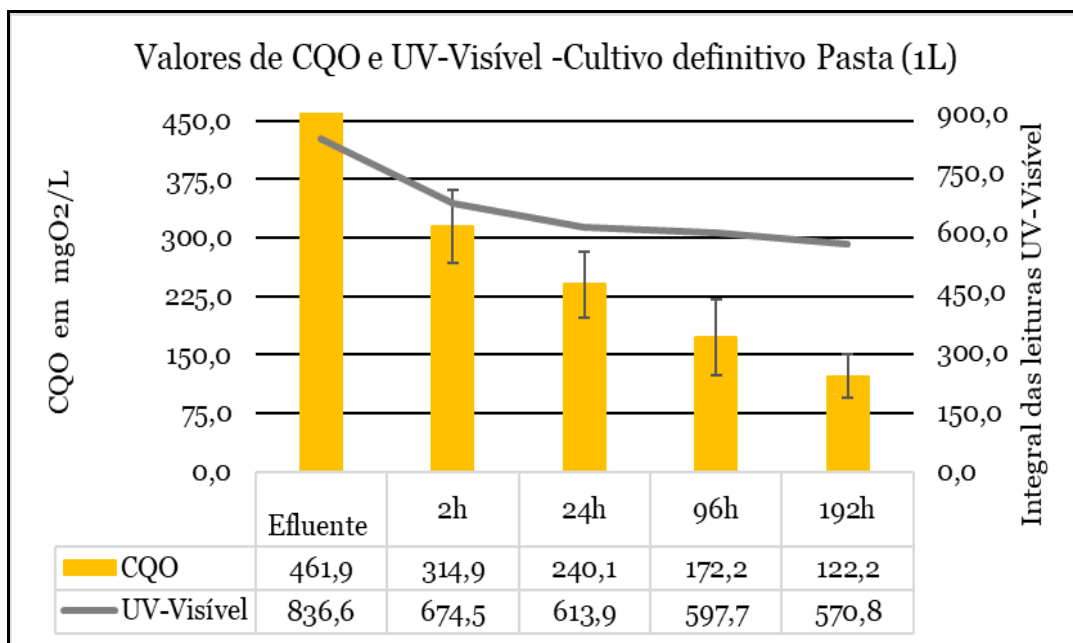


Figura 62 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos com efluente da pasta papel.

#### 4.3.4. Evolução da CQO e absorbância no UV-Visível no ensaio com glucose

A figura 63 mostra que durante os primeiros 4 dias não se verificou uma remoção significativa da CQO, tendo-se verificado uma redução muito significativa da CQO e absorbância entre os 4 e 8 dias. Estes resultados sugerem uma adaptação inicial da microalga do regime autotrófico para o regime heterotrófico. Ao cabo dos 8 dias, houve uma remoção de 70% de glucose do meio. No que diz respeito à absorbância integrada (200 a 800nm), como era de se esperar os valores são bastante inferiores ao dos meios com efluentes. Ainda sim, a redução de absorbância foi de 76,3%, a maior de todos os cultivos.

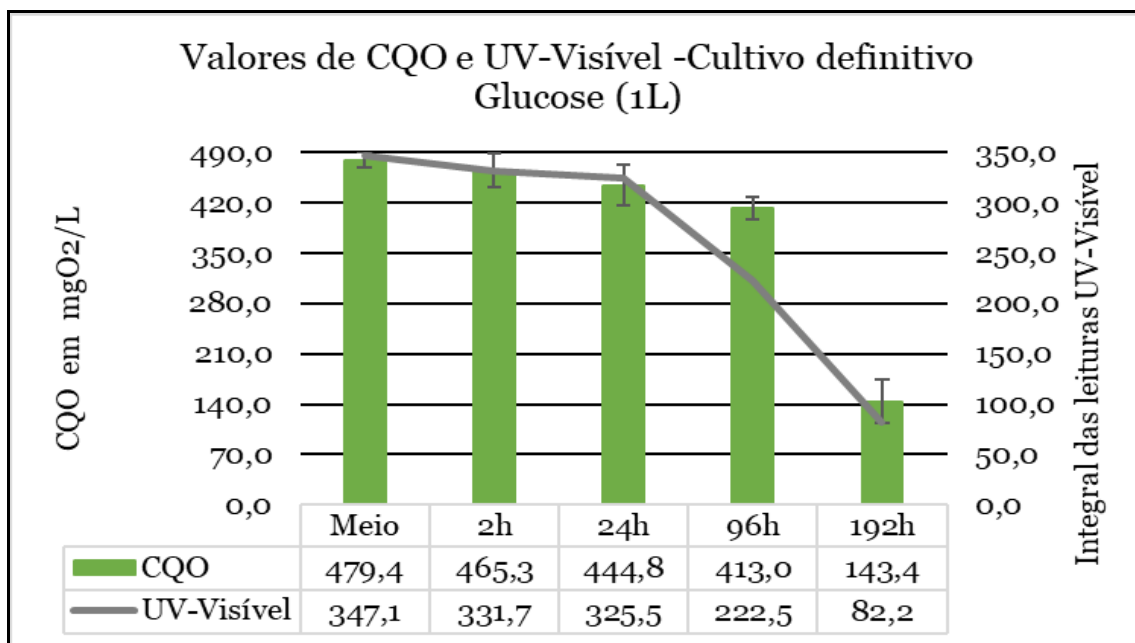


Figura 63 – Evolução temporal da remoção de matéria orgânica e a absorbância acumulada (gama do UV-Visível) dos cultivos controles com adição de glucose.

#### 4.3.5. Comparação de tratamento de efluentes dos cultivos

Nas próximas figuras 64 e 65 faz-se a comparação dos perfis temporais da CQO e da absorbância acumulada na gama dos 200 nm aos 800nm, para os diferentes cultivos.

Conjugando os resultados da figura 64 com os da figura 57, fica claro que o CO<sub>2</sub> injetado ao longo do cultivo foi suficiente para a multiplicação celular, mas não se traduziu num incremento da massa de cada célula. Por outro lado, a análise dos perfis iniciais da CQO sugerem que deve haver fenómenos de adsorção de alguns compostos dos efluentes na biomassa algal, já que a queda abrupta da CQO não é compatível com uma cinética de degradação efetiva dos componentes do efluente. A glucose parece adsorver muito menos na biomassa, mantendo-se o CQO praticamente em patamar até às 100h, apesar do crescimento em número e em massa ser o maior (Figuras 57 e 58). Os dados da figura 64 suportam uma degradação gradual, mas efetiva dos compostos dos efluentes, especialmente o efluente da indústria de pasta; muito possivelmente a maior parte dos compostos orgânicos no efluente da pasta para papel eram biodegradáveis<sup>233,234</sup>, tendo, por isso, apresentado maior remoção face ao efluente têxtil. Por outro lado, o consumo de glucose parece ocorrer apenas entre as 100h e as 190h, apesar do constante crescimento em número das microalgas. Estes resultados sugerem uma alteração no seu metabolismo, possivelmente a passagem de uma fase autotrófica para outra heterotrófica<sup>140</sup>.

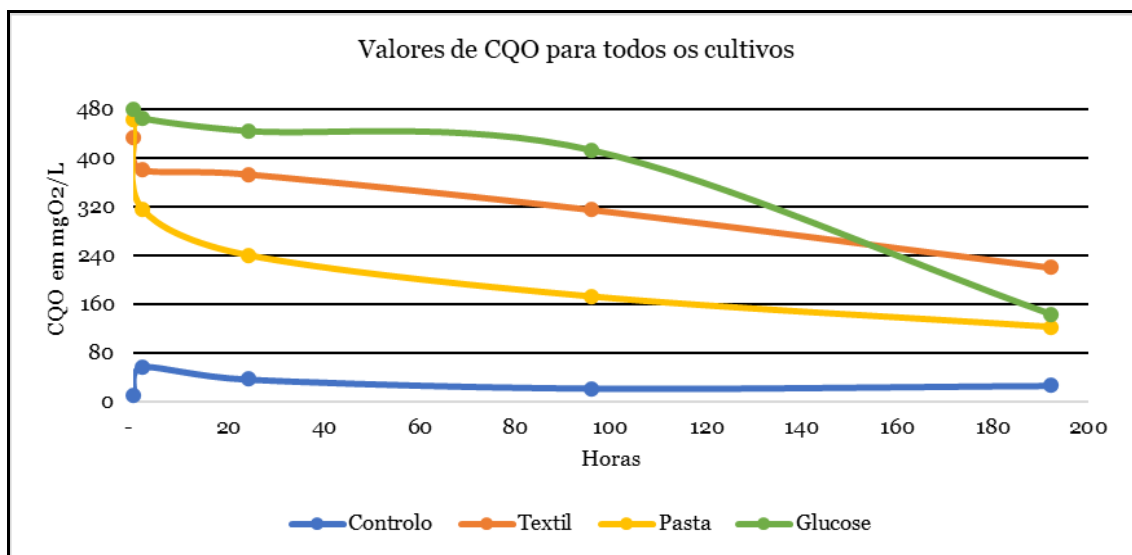


Figura 64 - Comparação entre a variação da CQO nos diferentes cultivos em escala linear.

É interessante notar como a tendência de remoção da CQO nos efluentes é similar, apesar de no final terem sido removidas quantidades diferentes de matéria orgânica; este fato sugere que a microalga *Selenastrum sp* reage de forma semelhante a diferentes tipos de estresses provenientes de diferentes efluentes, ou seja, que utilizou os mesmos mecanismos metabólicos no tratamento dos efluentes. Enquanto para os efluentes parece haver uma assimilação lenta, mas continuada ao longo do tempo, no caso da glucose nas primeiras 100h regista-se um consumo marginal.

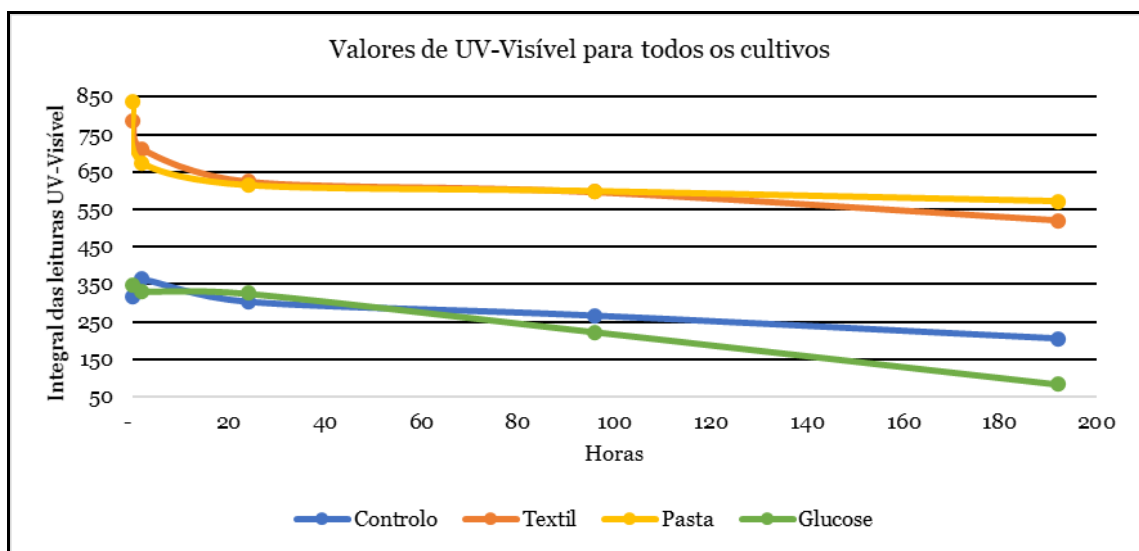


Figura 65 - Comparação entre os valores da integral de absorção (200 a 800nm) nos diferentes cultivos em escala linear.

A figura 65 ilustra a natureza completamente diferente dos efluentes face aos ensaios controlo e com glucose; como esperado, os efluentes são corados. A queda inicial da

absorbância nestes meios é compatível com a hipótese de adsorção de contaminantes na biomassa algal. Para além desta queda inicial, a diminuição efetiva de cor do meio é reduzida e menor do que a correspondente remoção da CQO. Após as 24 horas de cultivo, com a exceção da glucose, todos os cultivos mostram uma diminuição gradual da cor.

## 5. Conclusão e perspectivas futuras

Considerando o que foi analisado, em todos os cultivos ocorreu diminuição dos valores da CQO e das absorbâncias no UV-Visível, com os efluentes e cultivo com glucose apresentando uma diminuição média de 61,1% no teor da CQO em 192 horas (8 dias). Os valores de remoção para o efluente têxtil e pasta para papel foram de 49,2% e 64,3% respetivamente, o que demonstra o potencial do sistema. Importante notar também que segundo as leituras feitas no espectrofotómetro muitos outros compostos foram removidos (entre eles os corantes).

Para além do tratamento de efluentes, o intuito deste trabalho foi comprovar o crescimento da microalga *Selenastrum sp.* em efluentes industriais, demonstrar a sua eficácia no tratamento de efluentes e antever a utilização da biomassa. Estes objetivos foram alcançados ao longo de seis meses de trabalho, cultivos e análises, tendo-se obtido ao cabo de 8 dias, 9,8 milhões de células por mL em média, aumento no peso da biomassa seca em 34,8x e remoção de 61,1% de matéria orgânica, além de outros compostos inorgânicos. A possibilidade de utilizar esta alga, não apenas para tratamentos de efluentes, como também para produção de produtos de alto valor agregado (pigmentos/compostos para fármacos) ou de combustíveis e fertilizantes, tanto individualmente quanto em conjunto, é evidenciado com tais resultados.

Em resumo, os resultados permitem concluir que a *Selenastrum sp.* é eficiente na remoção de compostos indesejáveis em diferentes efluentes industriais, gerando uma oportunidade de melhoramento das técnicas e métodos para aumentar ainda mais a sua eficácia.

Em trabalhos futuros, seria importante definir melhor os efeitos de cada parâmetro no crescimento, desenvolvimento e acumulação de compostos na microalga *Selenastrum sp.*, e assim determinar as condições de cultura ótimas para este género. Seria igualmente interessante monitorar os compostos específicos do efluente, incluindo corantes, metais pesados, entre outros. Em alternativa poderia utilizar-se efluentes sintéticos para avaliar a capacidade de remover/assimilar compostos específicos.



## 6. Referências

1. Voituriez, T., Morita, K., Giordano, T., Bakkour, N. & Shimizu, N. Financing the 2030 agenda for sustainable development. *Gov. Through Goals Sustain. Dev. Goals as Gov. Innov.* 16301, 259–273 (2017).
2. Mostafa S., S. *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications.* *Plant Sci.* (2012) doi:10.5772/53694.
3. BP Statistical. *BP Statistical Review of World Energy About this review.* *BP Stat. Rev. World Energy Juny 2016 10* (2016).
4. Daroch, M., Geng, S. & Wang, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy* 102, 1371–1381 (2013).
5. Kaenchan, P. & Gheewala, S. H. Budget constraint and the valuation of environmental impacts in Thailand. *Int. J. Life Cycle Assess.* 22, 1678–1691 (2017).
6. Dalrymple, O. K. et al. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: A review and preliminary results. *Aquat. Biosyst.* 9, 1–11 (2013).
7. Lutz, G. A., Zhang, W. & Liu, T. Feasibility of using brewery wastewater for biodiesel production and nutrient removal by *Scenedesmus dimorphus*. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 37, 1568–1581 (2016).
8. Ji, M. K. et al. Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2701–2710 (2013).
9. Ji, M. K. et al. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecol. Eng.* 58, 142–148 (2013).
10. Saïdane-Bchir, F., El Falleh, A., Ghabbarou, E. & Hamdi, M. 3rd Generation Bioethanol Production from Microalgae Isolated from Slaughterhouse Wastewater. *Waste and Biomass Valorization* 7, 1041–1046 (2016).
11. Pescod, M. B. Wastewater treatment and use in agriculture - FAO irrigation and drainage. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome vol. 47* (1992).

12. Kligerman, D. C. & Bouwer, E. J. Prospects for biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 1834–1846 (2015).
13. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4576–4579 (1990).
14. Falkowski, P. G. et al. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* (80-. ). 305, 354–360 (2004).
15. Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Naidu, R. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. *Biotechnol. Adv.* 29, 896–907 (2011).
16. Sahu, N. & Tangutur, A. D. Airborne algae: overview of the current status and its implications on the environment. *Aerobiologia (Bologna)*. 31, 89–97 (2015).
17. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. & Ibraheem, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 257–275 (2012).
18. Gupta, S., Pawar, S. B. & Pandey, R. A. Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. *Sci. Total Environ.* 687, 1107–1126 (2019).
19. Brennan, L. & Owende, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 557–577 (2010).
20. Gatamaneni, B. L., Orsat, V. & Lefsrud, M. Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species. *Environ. Eng. Sci.* 35, 1037–1048 (2018).
21. Takaichi, S. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Mar. Drugs* 9, 1101–1118 (2011).
22. Chan, K. C., Mong, M. C. & Yin, M. C. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J. Food Sci.* 74, 225–231 (2009).
23. Marin, D. P., Bolin, A. P., MacEdo, R. D. C. S., Sampaio, S. C. & Otton, R. ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *Int. Immunopharmacol.* 11, 103–109 (2011).

24. León, R. & Galván, F. Interaction between saline stress and photoinhibition of photosynthesis in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Implications for glycerol photoproduction. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 623–628 (1999).
25. Jin, E., Polle, J. E. W., Lee, H. K., Hyun, S. M. & Chang, M. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 165–174 (2003).
26. Ambati, R. R. et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 59, 1880–1902 (2019).
27. Novoveská, L. et al. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Mar. Drugs* 17, 1–21 (2019).
28. Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. & Abd\_Allah, E. F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* 26, 709–722 (2019).
29. Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T. & Arunkumar, K. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *J. Clean. Prod.* 228, 1320–1333 (2019).
30. Bhattacharya, M. & Goswami, S. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 25, 101580 (2020).
31. Mathimani, T. & Pugazhendhi, A. Utilization of algae for biofuel, bio-products and bio-remediation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17, 326–330 (2019).
32. Aliyu, A., Lee, J. G. M. & Harvey, A. P. Microalgae for biofuels via thermochemical conversion processes: A review of cultivation, harvesting and drying processes, and the associated opportunities for integrated production. *Bioresour. Technol. Reports* 14, 100676 (2021).
33. Reinsch, P.F. (1866). Die Algenflora des mittleren Theiles von Franken (des Keupergebietes mit den angrenzenden Partien des jurassischen Gebietes) enthaltend die vom Autor bis jetzt in diesen Gebieten beobachteten Susswasseralgen und die Diagnosen und Abbildungen von ein und funfzig vom Autor in diesem gebiete entdeckten neuen Arten und drei neuen Gattungen. *Abhandlungen der Naturhistorischen Gesellschaft zu Nürnberg* 3(2): 1-238, pls I-XIII.

34. Krienitz, L., Bock, C., Nozaki, H. & Wolf, M. Ssu rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga 'senastrum capricornutum' recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta. *J. Phycol.* 47, 880–893 (2011).
35. Van Vuuren, S., Taylor, J. C., Gerber, A. & Van Ginkel, C. Easy identification of the most common freshwater algae. North-West University and Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria, South Africa (2006).
36. M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2021. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 12 September 2021.
37. Ouyang, Y., Zhao, Y., Sun, S., Hu, C. & Ping, L. Effect of light intensity on the capability of different microalgae species for simultaneous biogas upgrading and biogas slurry nutrient reduction. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 157–163 (2015).
38. Wijeyaratne, W. M. D. N. & Nanayakkara, D. B. M. Monitoring of water quality variation trends in a tropical urban wetland system located within a Ramsar wetland city: A GIS and phytoplankton based assessment. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* 14, 100323 (2020).
39. Sasireka G. and Muthu Velayudham R. STUDY OF GROWTH PARAMETERS ON MEMBERS OF CHLOROCOCCALES. *International Journal of Current Advanced Research.* Volume 7. 15919-15922.(2018)
40. IDRISSE ABDELKHALEK, E., MOHAMED, B., MOHAMMED, A., & LOTFI, A. (2016). Growth performance and biochemical composition of nineteen microalgae collected from different Moroccan reservoirs. *Mediterranean Marine Science*, 17(1), 323-332. doi:<https://doi.org/10.12681/mms.1320>
41. Sasireka, G. & Muthuvelayudham, R. Biomass Production and GC-MS Analysis of *Senastrum bibrainum* Reinsch. 9, 44–50 (2018).
42. Khatoon, H., Rahman, N. A., Suleiman, S. S., Banerjee, S. & Abol-Munafi, A. B. Growth and Proximate Composition of *Scenedesmus obliquus* and *Senastrum bibrainum* Cultured in Different Media and Condition. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B - Biol. Sci.* 89, 251–257 (2019).
43. Soares, A. T., da Costa, D. C., Vieira, A. A. H. & Antoniosi Filho, N. R. Analysis of major carotenoids and fatty acid composition of freshwater microalgae. *Heliyon* 5, e01529 (2019).

44. Algas, L. D. E. L. A. S. & Dulciacu, C. Catálogo de las algas y cianoprocariontes dulciacuícolas de Cuba.
45. Núñez-avellaneda, M. Chlorococcales (Algae: Chlorophyceae) found in aquatic environments of the Colombian Amazon basin Chlorococcales (Algae: Chlorophyceae) found in aquatic environments of the Colombian Amazon basin. *Caldasia* 20, 5–11 (1998).
46. Ficológia, D. C. et al. CHLOROCOCCALES DE LA AMAZONIA COLOMBIANA I: Chlorellaceae y Scenedesmaceae. *Caldasia* 26, 37–51 (2004).
47. Forzza, R. C. et al. Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Vol. 1. Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Vol. 1 vol. 1 (2010).
48. Molnár, Z. & Ördög, V. Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue cultures of higher plants (pea, tobacco, beet). *Acta Biol. Szeged.* 49, 39–40 (2005).
49. Alves, M.I.R., Soares, A.T., Costa, D.C., Marques Jr, J.G., Vieira, A.A.H., Fernandes V.O., Filho, N.R.A. Análise do perfil de ácidos graxos e pigmentos em biomassa de microalgas cultivadas na região sudeste visando à produção de biodiesel e betacaroteno. ISBN 978-85-65615-02-0. 103-104 (2016).
50. Petrick, I., Dombrowski, L., Kröger, M., Beckert, T., Kuchling, T., Kureti, S. Algae Biorefinery – Material and energy use of algae. DBFZ Report No° 16. DBFZ Deutsches Biomasseforschungszentrum gemeinnützige GmbH, Leipzig. ISSN: 2190-7943. (2013).
51. Wencker, T., Storandt, R., Waldeck, P., Dinske, J., Lehmann, W. Microalgae and Aquaculture – feed and cycle management. Abschlussbericht zum DBY-Projekt der Förderinitiative. Nachhaltige Aquakultur. Institut für Getreideverarbeitung GmbH. (2013).
52. Storandt, R., Dautz, J., Dinske, J., Lehmann, W. Entwicklung eines Konzeptes und Schaffung von Einrichtungen zur nachhaltigen Erzeugung fettsaurereicher Mikroalgen zur Fischolsubstitution und Futtermittelaufwertung. Abschlussbericht zum DBY-Projekt der Förderinitiative. Nachhaltige Aquakultur. Institut für Getreideverarbeitung GmbH. (2015).
53. John, D. M. & Meehan, N. H. The Freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. *Choice Rev. Online* 49, 49-6880-49–6880 (2012).

54. Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S. & Wang, G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv.* 29, 568–574 (2011).
55. Rahman, K.M., 2020. Food and high value products from microalgae: market opportunities and challenges, in: Alam, M., Xu J.L., Wang Z., *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer, pp. 3e27. [https:// doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_1).
56. Acién, F. G., Fernández, J. M., Magán, J. J. & Molina, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353 (2012).
57. Mehariya, S., Goswami, R. K., Karthikeysan, O. P. & Verma, P. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere* 280, 130553 (2021).
58. Levasseur, W., Perré, P. & Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnol. Adv.* 41, 107545 (2020).
59. Chen, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10 (2013).
60. Chang, L. et al. Structural organization of an intact phycobilisome and its association with photosystem II. *Cell Res.* 25, 726–737 (2015).
61. Chang, H. X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q. & Zhu, X. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO<sub>2</sub> biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresour. Technol.* 206, 231–238 (2016).
62. Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. & Heredia, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.* 101, 1145–1150 (2007).
63. Borowitzka, M.A. (1988) Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J., (eds.) *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 153-196.
64. Esteban, R., Martínez, B., Fernández-Marín, B., Becerril, J. M. & García-Plazaola, J. I. Carotenoid composition in Rhodophyta: Insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. *Eur. J. Phycol.* 44, 221–230 (2009).

65. Kajikawa, T. et al. Stereocontrolled total synthesis of fucoxanthin and its polyene chain-modified derivative. *Org. Lett.* 14, 808–811 (2012).
66. Egeland, E.S. Carotenoids. In *The Physiology of Microalgae: Developments in Applied Phycology*; Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 507–563
67. Xia, S. et al. Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar. Drugs* 11, 2667–2681 (2013).
68. Lemoine, Y. & Schoefs, B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multifunctional response to stress. *Photosynth. Res.* 106, 155–177 (2010).
69. Torregrosa-Crespo, J. et al. Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. *Mar. Drugs* 16, (2018).
70. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J. & Adholeya, A. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front. Microbiol.* 7, 1–19 (2016).
71. Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J. & Huang, H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1–16 (2018).
72. Santhosh, S., Dhandapani, R. & Hemalatha, N. Bioactive compounds from Microalgae and its different applications- a review. *Adv. Appl. Sci. Res.* 7, 153–158 (2016).
73. Williams, P. J. L. B. & Laurens, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ. Sci.* 3, 554–590 (2010).
74. Barkia, I., Saari, N. & Manning, S. R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Mar. Drugs* 17, 1–29 (2019).
75. Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M. & Tiwari, B. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods* 6, 1–21 (2017).
76. Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M. & Wiebe, M. G. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Front. Microbiol.* 8, (2017).

77. Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K. & Dunstan, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331 (1997).
78. Younes, Ghasemi & Rasoul-Amini, Sara & Morowvat, Mohammad Hossein. (2011). Algae for the production of SCP. *Bioprocess Sciences and Technology*. 163-184.
79. Fu, Y. et al. The potentials and challenges of using microalgae as an ingredient to produce meat analogues. *Trends Food Sci. Technol.* 112, 188–200 (2021).
80. Ansari, F. A., Shriwastav, A., Gupta, S. K., Rawat, I. & Bux, F. Exploration of Microalgae Biorefinery by Optimizing Sequential Extraction of Major Metabolites from *Scenedesmus obliquus*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 56, 3407–3412 (2017).
81. Zarrinmehr, M. J. et al. Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *Egypt. J. Aquat. Res.* 46, 153–158 (2020).
82. Janssen, P. J. et al. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* 5, (2010).
83. Rafiqul, I. M. et al. Salt Stress Culture of Blue-green Algae *Spirulina fusiformis*. *Pakistan J. of Biological Sciences* 6, 648–650 (2003).
84. Soto-Sierra, L., Stoykova, P. & Nikolov, Z. L. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Res.* 36, 175–192 (2018).
85. Moss, G. P., Smith, P. A. S. & Tavernier, D. Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure (IUPAC recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* 67, 1307–1375 (1995).
86. Mubarak, M., Shaija, A. & Suchithra, T. V. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Res.* 7, 117–123 (2015).
87. Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A. & Morones-Ramírez, J. R. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb. Cell Fact.* 18, 1–17 (2019).



88. Althoff, T., Mills, D. J., Popot, J. L. & Kühlbrandt, W. Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I<sub>1</sub> III<sub>2</sub> IV<sub>1</sub>. *EMBO J.* 30, 4652–4664 (2011).
89. Gopalakrishnan, V. & Ramamurthy, D. Dyeing Industry Effluent System as Lipid Production Medium of *Neochloris* sp. for Biodiesel Feedstock Preparation. *Biomed Res. Int.* 2014, (2014).
90. Mathieu-Rivet, E. et al. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. *Front. Plant Sci.* 5, 1–13 (2014).
91. Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67, 696–701 (2006).
92. Makewicz, A., Gribi, C. & Eichenberger, W. Lipids of *Ectocarpus fasciculatus* (Phaeophyceae). Incorporation of [1-<sup>14</sup>C]oleate and the role of TAG and MGDG in lipid metabolism. *Plant Cell Physiol.* 38, 952–960 (1997).
93. Ruiz, J. et al. Towards industrial products from microalgae. *Energy Environ. Sci.* 9, 3036–3043 (2016).
94. Ferreira, G. F., Ríos Pinto, L. F., Maciel Filho, R. & Fregolente, L. V. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 109, 448–466 (2019).
95. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96 (2006).
96. Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S. & Garg, M. O. Algae based biorefinery - How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307 (2015).
97. Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M. & Hu, Q. Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 123–129 (2011).
98. Wu, Y. H., Yu, Y. & Hu, H. Y. Potential biomass yield per phosphorus and lipid accumulation property of seven microalgal species. *Bioresour. Technol.* 130, 599–602 (2013).

99. Liu, Z. Y., Wang, G. C. & Zhou, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 99, 4717–4722 (2008).
100. Aussant, J., Guihéneuf, F. & Stengel, D. B. Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 5279–5297 (2018).
101. He, Q., Yang, H. & Hu, C. Effects of temperature and its combination with high light intensity on lipid production of *Monoraphidium dybowskii* Y2 from semi-arid desert areas. *Bioresour. Technol.* 265, 407–414 (2018).
102. Van Wagenen, J. et al. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies* 5, 731–740 (2012).
103. Guihéneuf, F. & Stengel, D. B. LC-PUFA-enriched oil production by microalgae: Accumulation of lipid and triacylglycerols containing n-3 LC-PUFA is triggered by nitrogen limitation and inorganic carbon availability in the marine haptophyte *Pavlova lutheri*. *Mar. Drugs* 11, 4246–4266 (2013).
104. Guschina, I. A. & Harwood, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160–186 (2006).
105. Richmond, A. & others. Biological principles of mass cultivation. *Handb. microalgal Cult. Biotechnol. Appl. Phycol.* 125–177 (2004).
106. Quinn, J. C. & Davis, R. The potentials and challenges of algae based biofuels: A review of the techno-economic, life cycle, and resource assessment modeling. *Bioresour. Technol.* 184, 444–452 (2015).
107. Robles Medina, A. et al. Lipase-catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils. *Prog. Ind. Microbiol.* 35, 379–391 (1999).
108. Akoh, C. C. & Min, D. B. Food Lipids. *Food Lipids* (2002). doi:10.1201/9780203908815.
109. Katiyar, R. & Arora, A. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. *Algal Res.* 46, 101800 (2020).
110. Raja, R. et al. Applications of microalgal paste and powder as food and feed: An update using text mining tool. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 7, 740–747 (2018).

111. Chaïb, S., Pistevos, J. C. A., Bertrand, C. & Bonnard, I. Allelopathy and allelochemicals from microalgae: An innovative source for bio-herbicidal compounds and biocontrol research. *Algal Res.* 54, (2021).
112. Abu-Ghosh, S., Dubinsky, Z., Verdelho, V. & Iluz, D. Unconventional high-value products from microalgae: A review. *Bioresour. Technol.* 329, 124895 (2021).
113. Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H. & Prior, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. *Biotechnol. Adv.* 19, 201–223 (2001).
114. Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Egorova-Zachernyuk, T. A. & Molina Grima, E. Cost-effective production of <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. *Biomol. Eng.* 22, 193–200 (2005).
115. Makut, B. B., Das, D. & Goswami, G. Production of microbial biomass feedstock via co-cultivation of microalgae-bacteria consortium coupled with effective wastewater treatment: A sustainable approach. *Algal Res.* 37, 228–239 (2019).
116. Fuentes, J. L. et al. Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Mar. Drugs* 14, (2016).
117. Wang, S. et al. Defensive responses of microalgal-bacterial granules to tetracycline in municipal wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 312, 123605 (2020).
118. García, J., Mujeriego, R. & Hernández-Mariné, M. High rate algal pond operating strategies for urban wastewater nitrogen removal. *J. Appl. Phycol.* 12, 331–339 (2000).
119. de Godos, I., Arbib, Z., Lara, E. & Rogalla, F. Evaluation of High Rate Algae Ponds for treatment of anaerobically digested wastewater: Effect of CO<sub>2</sub> addition and modification of dilution rate. *Bioresour. Technol.* 220, 253–261 (2016).
120. Sepehri, A. & Sarrafzadeh, M. H. Effect of nitrifiers community on fouling mitigation and nitrification efficiency in a membrane bioreactor. *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 128, 10–18 (2018).
121. Fallahi, A. et al. Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. *Chemosphere* 272, 129878 (2021).

122. Flores-Salgado, G., Thalasso, F., Buitrón, G., Vital-Jácome, M. & Quijano, G. Kinetic characterization of microalgal-bacterial systems: Contributions of microalgae and heterotrophic bacteria to the oxygen balance in wastewater treatment. *Biochem. Eng. J.* 165, (2021).
123. Tao, R., Lakaniemi, A. M. & Rintala, J. A. Cultivation of *Scenedesmus acuminatus* in different liquid digestates from anaerobic digestion of pulp and paper industry biosludge. *Bioresour. Technol.* 245, 706–713 (2017).
124. Paliwal, C. et al. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresour. Technol.* 244, 1216–1226 (2017).
125. Ananthi, V., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A. & Arun, A. Impact of abiotic factors on biodiesel production by microalgae. *Fuel* 284, 118962 (2021).
126. Chen, M. et al. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* 102, 1649–1655 (2011).
127. Khan, M. I., Shin, J. H. & Kim, J. D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* 17, 1–21 (2018).
128. Nursalam, 2016, metode penelitian & Fallis, A. . Sustaining water : population and the future of renewable water supplies. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699 (1993).
129. Cosgrove, B. & Rijsberman, F. World water vision. *Journal of Hydraulic Research/De Recherches Hydrauliques* vol. 38 (2000).
130. Abdel-Raouf, M. E., Maysour, N., Farag, R. K. & Abdul-Raheim, M. Wastewater Treatment Methodologies , Review Article *International Journal of Environment & Agricultural Science Wastewater Treatment Methodologies , Review Article.* *Int. J. Environ. Agric. Sci.* 3, 1–25 (2019).
131. United Nations. Economic and Social Commission for Western Asia input to the High-Level Political Forum on Sustainable Development and the ECOSOC Annual Ministerial Review. United Nations, Distr. Gen. E/ESCWA/SDPD (2014).
132. Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A. & Gutierrez, T. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Sci. Total Environ.* 752, 142168 (2021).

133. Metcalf, & Eddy Inc. (1991). Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse (3rd ed.). In G. Tchobanoglous, & F. L. Burton (Eds.), New York: McGraw-Hill. (1991).
134. Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th Edition, McGraw-Hill, Boston. (2003).
135. Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88, 3411–3424 (2011).
136. Singh, S. P. & Singh, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 431–444 (2015).
137. Oswald, W. J. My sixty years in applied algology. *J. Appl. Phycol.* 15, 99–106 (2003).
138. Arun, J., Varshini, P., Prithvinath, P. K., Priyadarshini, V. & Gopinath, K. P. Enrichment of bio-oil after hydrothermal liquefaction (HTL) of microalgae *C. vulgaris* grown in wastewater: Bio-char and post HTL wastewater utilization studies. *Bioresour. Technol.* 261, 182–187 (2018).
139. Davis, R. et al. Process Design and Economics for the Production of Algal Biomass: Algal Biomass Production in Open Pond Systems and Processing Through Dewatering for Downstream Conversion. *Natl. Renew. Energy Lab.* 128 (2016).
140. Daneshvar, E. et al. Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresour. Technol.* 329, (2021).
141. Cheirsilp, B. & Torpee, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.* 110, 510–516 (2012).
142. Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M. & Tys, J. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering* vol. 37 735–741 (2014).
143. Khoo, K. S. et al. Recent advances in downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 304, 122996 (2020).

144. Chew, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour. Technol.* 229, 53–62 (2017).
145. Straka, L. & Rittmann, B. E. Light-dependent kinetic model for microalgae experiencing photoacclimation, photodamage, and photodamage repair. *Algal Res.* 31, 232–238 (2018).
146. Huang, J., Hankamer, B. & Yarnold, J. Design scenarios of outdoor arrayed cylindrical photobioreactors for microalgae cultivation considering solar radiation and temperature. *Algal Res.* 41, 101515 (2019).
147. Xu, X., Gu, X., Wang, Z., Shatner, W. & Wang, Z. Progress, challenges and solutions of research on photosynthetic carbon sequestration efficiency of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 110, 65–82 (2019).
148. Venkata Subhash, G., Rohit, M. V., Devi, M. P., Swamy, Y. V. & Venkata Mohan, S. Temperature induced stress influence on biodiesel productivity during mixotrophic microalgae cultivation with wastewater. *Bioresour. Technol.* 169, 789–793 (2014).
149. Suthar, S. & Verma, R. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. *Process Saf. Environ. Prot.* 113, 141–148 (2018).
150. Bilad, M. R., Arafat, H. A. & Vankelecom, I. F. J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. *Biotechnol. Adv.* 32, 1283–1300 (2014).
151. Kim, G. Y., Roh, K. & Han, J. I. The use of bicarbonate for microalgae cultivation and its carbon footprint analysis. *Green Chem.* 21, 5053–5062 (2019).
152. Chang, H. X., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q. & Zhu, X. Kinetic characteristics and modeling of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and CO<sub>2</sub> biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon. *Bioresour. Technol.* 206, 231–238 (2016).
153. Miller, L. S. & Holt, S. C. Effect of carbon dioxide on pigment and membrane content in *Synechococcus lividus*. *Arch. Microbiol.* 115, 185–198 (1977).
154. Grobbelaar, J.U. Inorganic Algal Nutrition. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*; Richmond, A., Hu, Q., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd.: Oxford, UK, 2013; pp. 123–133. ISBN 978-1-118-56716-6.

155. Kaplan, D., Richmond, A., Dubinsky, Z., Aaronson, S., 2017. Algal nutrition. In: Handbook of Microalgal Mass Culture (1986). CRC Press, pp. 147–198.
156. Sonkar, S. & Mallick, N. An alternative strategy for enhancing lipid accumulation in chlorophycean microalgae for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 30, 2179–2192 (2018).
157. Wu, M., Huang, S., Zang, C., Du, S. & Scholz, M. Release of nutrient from fish food and effects on *Microcystis aeruginosa* growth. *Aquac. Res.* 43, 1460–1470 (2012).
158. Tandon, P., Jin, Q. & Huang, L. A promising approach to enhance microalgae productivity by exogenous supply of vitamins. *Microb. Cell Fact.* 16, 1–13 (2017).
159. Liu, J. et al. Effect of limitation of iron and manganese on microalgae growth in fresh water. *Microbiol. (United Kingdom)* 164, 1514–1521 (2018).
160. Fujii, M., Rose, A. L., Omura, T. & Waite, T. D. Effect of Fe(II) and Fe(III) transformation kinetics on iron acquisition by a toxic strain of *Microcystis aeruginosa*. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1980–1986 (2010).
161. Alexova, R. et al. Iron uptake and toxin synthesis in the bloom-forming *Microcystis aeruginosa* under iron limitation. *Environ. Microbiol.* 13, 1064–1077 (2011).
162. Wang, Y. et al. Differences in growth, pigment composition and photosynthetic rates of two phenotypes *Microcystis aeruginosa* strains under high and low iron conditions. *Biochem. Syst. Ecol.* 55, 112–117 (2014).
163. Qiu, Y., Wang, Z., Liu, F., Liu, J. & Zhou, T. Effect of different kinds of complex iron on the growth of *Anabaena flos-aquae*. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 40, 2889–2896 (2019).
164. Peers, G. & Price, N. M. A role for manganese in superoxide dismutases and growth of iron-deficient diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1774–1783 (2004).
165. Lu, W., Asraful Alam, M., Liu, S., Xu, J. & Parra Saldivar, R. Critical processes and variables in microalgae biomass production coupled with bioremediation of nutrients and CO<sub>2</sub> from livestock farms: A review. *Sci. Total Environ.* 716, 135247 (2020).

166. Hwang, S. W., Choi, H. Il & Sim, S. J. Acidic cultivation of *Haematococcus pluvialis* for improved astaxanthin production in the presence of a lethal fungus. *Bioresour. Technol.* 278, 138–144 (2019).
167. Rossi, S., Casagli, F., Mantovani, M., Mezzanotte, V. & Ficara, E. Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater. *Bioresour. Technol.* 305, 122995 (2020).
168. Maizatul, A. Y., Radin Mohamed, R. M. S., Al-Gheethi, A. A. & Hashim, M. K. A. An overview of the utilisation of microalgae biomass derived from nutrient recycling of wet market wastewater and slaughterhouse wastewater. *Int. Aquat. Res.* 9, 177–193 (2017).
169. Zhao, B. et al. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO<sub>2</sub> fixation. *Chem. Eng. Res. Des.* 89, 1758–1762 (2011).
170. Guo, X., Yao, L. & Huang, Q. Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae. *Bioresour. Technol.* 190, 189–195 (2015).
171. Vandamme, D., Foubert, I. & Muylaert, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.* 31, 233–239 (2013).
172. Kawai, S. & Murata, K. Biofuel production based on carbohydrates from both brown and red macroalgae: Recent developments in key biotechnologies. *Int. J. Mol. Sci.* 17, (2016).
173. Yin, Z. et al. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresour. Technol.* 301, 122804 (2020).
174. Suparmaniam, U. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 115, 109361 (2019).
175. Tan, X. B. et al. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese J. Chem. Eng.* 26, 17–30 (2018).
176. Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X. R. & Liu, C. Z. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.* 9, 178–189 (2009).



177. Sierra, E. et al. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem. Eng. J.* 138, 136–147 (2008).
178. Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S. & Raghavan, G. S. V. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76, 493–506 (2017).
179. Chew, K. W. et al. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 91, 332–344 (2018).
180. Lam, T. P., Lee, T. M., Chen, C. Y. & Chang, J. S. Strategies to control biological contaminants during microalgal cultivation in open ponds. *Bioresour. Technol.* 252, 180–187 (2018).
181. Wiley, P. et al. Microalgae Cultivation Using Offshore Membrane Enclosures for Growing Algae (OMEGA). *J. Sustain. Bioenergy Syst.* 03, 18–32 (2013).
182. Jia, Z., Liu, Y., Daroch, M., Geng, S. & Cheng, J. J. Screening, growth medium optimisation and heterotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 1667–1679 (2014).
183. Jędrzejczyk, M., Soszka, E., Czapnik, M., Ruppert, A. M. & Grams, J. Physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. in *Second and Third Generation of Feedstocks* 143–196 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/b978-0-12-815162-4.00006-9.
184. Velazquez-Lucio, J. et al. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: A review. *Biofuel Res. J.* 5, 780–791 (2018).
185. Sui, Z., Gizaw, Y. & Bemiller, J. N. Extraction of polysaccharides from a species of *Chlorella*. *Carbohydr. Polym.* 90, 1–7 (2012).
186. Khoo, K. S. et al. Liquid biphasic system: A recent bioseparation technology. *Processes* 8, 1–22 (2020).
187. Nitsos, C., Filali, R., Taidi, B. & Lemaire, J. Current and novel approaches to downstream processing of microalgae: A review. *Biotechnol. Adv.* 45, 107650 (2020).
188. Carrillo-Reyes, J., Barragán-Trinidad, M. & Buitrón, G. Biological pretreatments of microalgal biomass for gaseous biofuel production and

- the potential use of rumen microorganisms: A review. *Algal Res.* 18, 341–351 (2016).
189. Shuba, E. S. & Kifle, D. Microalgae to biofuels: ‘Promising’ alternative and renewable energy, review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 81, 743–755 (2018).
  190. Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232 (2010).
  191. Ogbonna, C. N. & Nwoba, E. G. Bio-based flocculants for sustainable harvesting of microalgae for biofuel production. A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 139, 110690 (2021).
  192. Mohiyaden, H. A. et al. Conventional methods and emerging technologies for urban river water purification plant: A short review. *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 11, 2547–2556 (2016).
  193. Mustafa, H. M. & Hayder, G. Recent studies on applications of aquatic weed plants in phytoremediation of wastewater: A review article. *Ain Shams Eng. J.* 12, 355–365 (2021).
  194. World Health Organization. (2017). Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum, 4th ed + 1st add. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254637>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
  195. UN. General Assembly (70th sess.: 2015-2016). General Assembly official records, 70th session : 80th plenary meeting, Thursday, 17 December 2015, New York. a/70/Pv.80 0506, (2015).
  196. European Council Directive 2000/60/EC of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. European Parliament. OJL327, 22.12.2000, p. 1–73.
  197. Assembleia da República. Lei n.º 58/2005. Diário da República — I Série - A N.º 249 - 29 Dezembro 2005 7280–7310 (2005).
  198. Ministério do Ambiente. Decreto-Lei n.º 236/98. Diário da República n.º 176/1998, Série I-A 1998-08-01 No 176, 3676–3722 (1998).
  199. Decreto-Lei no 306/2007. Decreto-Lei n.º 306/2007 do Ministério Do Ambiente , Do Ordenamento Do Território E Do Desenvolvimento

Regional de 27 de Agosto sobre a regulação da qualidade da água utilizada para consumo humano. Diário da República I Série 5747–5765 (2007).

200. Kamali, M. & Khodaparast, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 114, 326–342 (2015).
201. Doble M, Kumar A. Paper and pulp biotreatment of industrial effluents, 1st ed..Burlington: Butterworth-Heinemann; 2005.
202. Toczyłowska-Mamińska, R. Limits and perspectives of pulp and paper industry wastewater treatment – A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 78, 764–772 (2017).
203. Karrasch, B. et al. Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. *Sci. Total Environ.* 359, 194–208 (2006).
204. Ashrafi, O., Yerushalmi, L. & Haghghat, F. Wastewater treatment in the pulp-and-paper industry: A review of treatment processes and the associated greenhouse gas emission. *J. Environ. Manage.* 158, 146–157 (2015).
205. Gentili, F. G. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. *Bioresour. Technol.* 169, 27–32 (2014).
206. Usha, M. T., Sarat Chandra, T., Sarada, R. & Chauhan, V. S. Removal of nutrients and organic pollution load from pulp and paper mill effluent by microalgae in outdoor open pond. *Bioresour. Technol.* 214, 856–860 (2016).
207. Gereffi G. Outsourcing and Changing Patterns of International Competition in the Apparel Commodity Chain. A background paper for UNIDO's. World Industrial Development Report 2001. (2002).
208. Keane, J. & te Velde, D. W. The role of textile and clothing industries in growth and development strategies. ODI Work. Pap. 1–71 (2008).
209. R Ananthashankar, A. G. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. *J. Chem. Eng. Process Technol.* 05, 1–18 (2013).
210. Moustafa S (2008) Process Analysis & Environmental Impacts of Textile Manufacturing. Dyes and Chemicals.

211. Pagga U, Brown D (1986) The degradation of dyestuffs: Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere* 15: 479-491.
212. Al-Kdasi, A., Idris, A., Saed, K. & Guan, C. T. Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes– A review. *Glob. Nest J.* 6, 222–230 (2004).
213. Yaseen, D. A. & Scholz, M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. *International Journal of Environmental Science and Technology* vol. 16 (Springer Berlin Heidelberg, 2019).
214. Samsami, S., Mohamadi, M., Sarrafzadeh, M. H., Rene, E. R. & Firoozbahr, M. Recent advances in the treatment of dye-containing wastewater from textile industries: Overview and perspectives. *Process Saf. Environ. Prot.* 143, 138–163 (2020).
215. Lim, S. L., Chu, W. L. & Phang, S. M. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresour. Technol.* 101, 7314–7322 (2010).
216. Kumar, G., Huy, M., Bakonyi, P., Bélafi-Bakó, K. & Kim, S. H. Evaluation of gradual adaptation of mixed microalgae consortia cultivation using textile wastewater via fed batch operation. *Biotechnol. Reports* 20, 0–6 (2018).
217. Dhaouefi, Z., Toledo-Cervantes, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. & Muñoz, R. Decolorization and phytotoxicity reduction in an innovative anaerobic/aerobic photobioreactor treating textile wastewater. *Chemosphere* 234, 356–364 (2019).
218. Fazal, T. et al. Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82, 3107–3126 (2018).
219. El-Kassas, H. Y. & Mohamed, L. A. Bioremediation of the textile waste effluent by *Chlorella vulgaris*. *Egypt. J. Aquat. Res.* 40, 301–308 (2014).
220. Lonza Cologne. Technical Reference Guide Cell Counting and Determination of Viability via Hemocytometer. *Tech. Guide.* 1–2 (2009).
221. American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Part 3000 Metals. 3111 Metals by Flame Atomic Absorption Spectrometry. 3111 B Direct Air - Acetylene Flame Method. *Stand. Methods Exam. Water Waste Water* 3–104 (1992).

222. Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A. & Montañez, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnol. Reports* 10, 117–125 (2016).
223. Silva, S. C., Ferreira, I. C. F. R., Dias, M. M. & Filomena Barreiro, M. Microalgae-derived pigments: A 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules* 25, (2020).
224. Method 410 . 3 : Chemical Oxygen Demand ( Titrimetric , High Level for Saline Waters ) by Titration TITLE : 3–6 (1978).
225. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Clean Water Act Methods Update Rule for the Analysis of Effluent. EPA. Federal Register. Vol. 86, No. 95. Rules and Regulations. (2021).
226. Fishman, M. J. & Friedman, L. C. Methods for determination of inorganic substances in water and fluvial sediments. *US Geol. Surv. Tech. Water-Resources Investig.* (1989).
227. ISO 6060 : 1989(R2017), "WATER QUALITY - DETERMINATION OF THE CHEMICAL OXYGEN DEMAND" International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1989, [www.iso.org](http://www.iso.org)
228. Lee, J., Lee, J., Shukla, S. K., Park, J. & Lee, T. K. Effect of algal inoculation on COD and nitrogen removal, and indigenous bacterial dynamics in municipal wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 900–908 (2016).
229. Lee, S. A., Lee, N., Oh, H. M. & Ahn, C. Y. Enhanced and balanced microalgal wastewater treatment (COD, N, and P) by interval inoculation of activated sludge. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1434–1443 (2019).
230. Xiao, R. & Zheng, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* 34, 1225–1244 (2016).
231. Vadlamani, A., Viamajala, S., Pendyala, B. & Varanasi, S. Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5, 7284–7294 (2017).
232. Canon-Rubio, K. A., Sharp, C. E., Bergerson, J., Strous, M. & De la Hoz Siegler, H. Use of highly alkaline conditions to improve cost-effectiveness of algal biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1611–1622 (2016).

233. Kamali, M., Gameiro, T., Costa, M. E. V. & Capela, I. Anaerobic digestion of pulp and paper mill wastes - An overview of the developments and improvement opportunities. *Chem. Eng. J.* 298, 162–182 (2016).
234. Sharma, N., Bhardwaj, N. K. & Singh, R. B. P. Environmental issues of pulp bleaching and prospects of peracetic acid pulp bleaching: A review. *J. Clean. Prod.* 256, 120338 (2020).
235. Chakravarty, S. & Mallick, N. Biomass and Bioenergy Optimization of lipid accumulation in an aboriginal green microalga *Selenastrum* sp. GA66 for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 126, 1–13 (2019).
236. Marika, T. et al. Conversion of biowaste leachate to valuable biomass and lipids in mixed cultures of *Euglena gracilis* and chlorophytes. 35, 76–84 (2018).
237. Cabanelas, I. T. D., Fernandes, C., Kleinegris, D. M. M., Wijffels, R. H. & Barbosa, M. J. Cell diameter doesn't affect lipid productivity of *Chlorococcum littorale*. *Algal Res.* 19, 333–341 (2016).
238. Chioccioli, M., Hankamer, B. & Ross, I. L. Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. *PLoS One*.