



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA  
BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**ISABELA DE LIMA MARQUES**

**CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DE  
MICROALGAS EM ESGOTO DOMÉSTICO VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BODIESEL**

**Recife, 2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA**  
**BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA**

Isabela de Lima Marques

**CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DE  
MICROALGAS EM ESGOTO DOMÉSTICO VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL**

Trabalho de conclusão de curso de Engenharia de Pesca da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Pesca, que foi equiparado ao projeto homônimo de Iniciação Científica realizado na Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Recife, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M357c Marques, Isabela de Lima  
CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DE MICROALGAS EM ESGOTO DOMÉSTICO  
VISANDO A PRODUÇÃO DE BIODIESEL / Isabela de Lima Marques. - 2019.  
26 f. : il.

Orientadora: Maria de Lourdes Florencio dos. Santos..  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em  
Engenharia de Pesca, Recife, 2023.

1. Efluente. 2. Esgoto doméstico. 3. Nutrientes. I. Santos., Maria de Lourdes Florencio dos., orient. II. Título

CDD 639.3

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA**

Isabela de Lima Marques

**CULTIVO FOTOTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E HETEROTRÓFICO DE  
MICROALGAS EM ESGOTO DOMÉSTICO VISANDO A PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL**

Monografia apresentada ao Departamento de Pesca e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco, *Campus* Sede, como requisito para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Pesca, equiparado ao Projeto de Iniciação Científica “**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA ALGAL EM ESGOTO DOMÉSTICO PARA GERAÇÃO DE BIODIESEL E METANO**” que foi produzido no LSA – UFPE (Laboratório de Saneamento Ambiental) da Universidade Federal de Pernambuco, com o título homônimo a este trabalho.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Florencio dos Santos

---

Dr.<sup>a</sup> Sílvia Mariana da Silva Barbosa/ Sanvale  
Membro titular

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Alfredo Olivera Gálvez / DEPAq – UFRPE  
Membro titular

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. José Carlos Pacheco dos Santos / UAST – UFRPE  
Membro Suplente

Recife, \_\_\_\_ dezembro 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao universo pela orientação, sabedoria e força. Pois, por muitas vezes o cansaço esteve presente, mas em nenhum momento o suficiente para que eu pensasse em desistir.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela estrutura e oportunidade de tornar possível a concretização de um sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico, por conceder a bolsa de iniciação científica.

À professora Suzianny Cabral, pelo acolhimento e apoio.

À professora Lourdinha Florencio, pela orientação e oportunidade.

Ao professor Alfredo Gálvez, pela credibilidade e incentivo.

À minha mãe, pela paciência e amor, mesmo nos dias mais difíceis e caóticos. Obrigada por acreditar em mim, muito mais que eu mesma.

Ao meu pai, pelas sábias palavras. Em especial as de fé e de resiliência, mesmo quando tudo parecia perdido. Obrigada por me escutar, fortalecer e acalmar.

Ao meu irmão, pelo apoio, todas as risadas e confidências. Talvez nem saibas da importância desses momentos para mim.

À mel, minha cadela, pelo amor incondicional.

A todos os meus familiares, em especial a minha tia Josele, pelas nossas conversas e gargalhadas. Obrigada por tudo.

Aos meus avós, todo meu carinho. Em especial para vovó Beta, *in memoriam*, por toda dedicação, amor e perseverança. Obrigada por tanto.

Às minhas amigas, Danielle Conrado, Juliana Batista, Luanna Reis e Tatiana Soares. Obrigada pelas gargalhadas, pela escuta, por enxugarem lágrimas e por vibrarem comigo. Vocês foram e são muito importantes durante toda essa jornada.

À Sílvia Mariana, pela orientação no desenvolvimento dos relatórios, pelo “vai dar certo” e pelos “acochos” quando necessário, sobretudo pela amizade que construímos.

Aos amigos de turma: Débora Portela, Gênisson Carneiro, José Filipe, Tainan Araújo e Ricardo Antônio. Pelos percalços vencidos, pelos estudos em grupo, pelos dias incríveis e experiências memoráveis que vivenciamos juntos. Especialmente, Thaíse Alves e Wilker Fonseca, pelo amor e confidências durante todos esses anos. E aos que foram incorporados durante a trajetória, mas não menos importantes: Bruno Assunção, Evelyn Possidônio,

Geyse Carvalho, Ícaro Freitas, Ivison Luiz, Marina Alves, Paulo Victor, Rodrigo Serafim, Victor Sacramento e Tiago Veiga.

Assim como os amigos dos laboratórios que tive a satisfação de trabalhar: Ana Paula, Jéssika Abreu, Laenne Moraes, Rildo Andrade e Yllana Marinho do LAPAVI – UFRPE (Laboratório de Produção de Alimento Vivo), e a Kamila Cardoso do LSA – UFPE (Laboratório de Saneamento Ambiental) pela amizade e pelas diversas análises em que erramos e que persistimos até alcançarmos os acertos – e os ensinamentos foram para a vida!

Sem esquecer dos colegas do LASAQ – UFRPE (Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos) pelo acolhimento, pelas conversas, pelos cafés, chás e bolachas que regaram as nossas tardes, entre uma análise e outra. E particularmente a Flávia Abreu e Paloma Alves pelas sugestões, correções e produções textuais.

Aos amigos da BC Transportes, Andrea Paula, Claudina Fontinelle, Jaqueline Oliveira, Reginaldo Fontinelle pelo apoio, compreensão e credibilidade. Nunca vou esquecer de todos os momentos em que mais precisei e vocês me deram a mão. A todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, inclusive com um sorriso, o meu muito obrigada!

## RESUMO

O aprimoramento de tecnologias no cultivo de microalgas usando efluentes domésticos implica na diminuição dos custos envolvidos na descontaminação das águas poluídas por estes efluentes, além de gerar insumos para obtenção de fontes de energia limpa. A produção de biocombustível a partir de microalgas tem como principais vantagens: (i) não competir por áreas agricultáveis, (ii) não necessitar de agrotóxicos e consumo excessivo de água e (iii) apresentar altas taxas de crescimento da biomassa com elevado teor lipídico intracelular. Desta forma, a presente pesquisa promoveu o cultivo da microalga *D. subspicatus* em efluente doméstico sob diferentes metabolismos energéticos, de modo a se otimizar a taxa de crescimento, a concentração de células em cultura, e assim identificar condições de cultivo que promovam o melhor crescimento de lipídeo intracelular, tornando a produção do biocombustível a partir de microalgas, mais sustentável economicamente e ambientalmente.

**Palavras-chave:** Efluente. Esgoto doméstico. Nutrientes.

## ABSTRACT

Improvement of technologies in the cultivation of microalgae using domestic wastewater implies the reduction of the costs involved in the decontamination of the polluted waters by these effluents, as well as generating inputs for obtaining clean energy sources. The biodiesel production from microalgae has the main advantages: (i) not competing for arable land, (ii) not needing pesticides and excessive water consumption, and (iii) presenting high growth rates and high lipid biomass intracellular. Thus, the present research promoted the cultivation of microalgae *D. subspicatus* in domestic wastewater under different energy metabolism, in order to optimize growth rates, concentrations of cells in culture, and therefore, identify the crop conditions that promotes better intracellular lipid production, making biofuel production from microalgae, more economically and environmentally sustainable.

**Keywords:** Effluentes. Domestic wastewater. Nutrients.



## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1 - (A) Efluente preparado aguardando inoculação (B) Imagem de microscópica de <i>D. subspicatus</i> .....	16
Figura 2 - (A) Tubos Falcon (B) Erlenmeyers, beakers e aquários utilizados na repicagem...	17
Figura 3 - (A) Câmara de Neubauer com quadrantes ampliados (B) quadrantes utilizados para contagem de amostras diluídas em evidência.....	19

## LISTA DE GRÁFICOS.

Gráfico 1 - Curvas de crescimento de <i>D. subspicatus</i> em metabolismo (▲)fototrófico, (■)mixotrófico e (●)heterotrófico ao longo dos 30 dias de cultivo .....	21
Gráfico 2 - Comportamento das concentrações de N-amoniaco e fósforo dissolvido no cultivo Fototrófico .....	22
Gráfico 3 - Comportamento das concentrações de N-amoniaco e fósforo dissolvido no cultivo Mixotrófico.....	22
Gráfico 4 - Comportamento das concentrações de N-amoniaco e fósforo dissolvido no cultivo Heterotrófico.....	22
Gráfico 5 - Sólidos suspensos totais ao longo do período de monitoramento.....	23
Gráfico 6 - Rendimento lipídico e da biomassa obtido ao longo do período de cultivo .....	24

## LISTA DE TABELAS.

Tabela 1 - Composição do meio comercial Provasoli com vitaminas do Complexo B. ....	17
Tabela 2 - Características físico-químicas e biológicas do efluente bruto usado como meio de cultivo. ....	20
Tabela 3 - Densidade celular média e Biomassa total .....	25
Tabela 4 - Eficiência de remoção de compostos presentes no efluente (%). ....	25

## LISTA DE EQUAÇÕES

[1] Equação para cálculo de volume de Cl a ser utilizado:

Volume  $H_2O$  x 0,014.

[2] Equação para cálculo de quantidade de tiosulfato de sódio:

Tiosulfato de Sódio =  $\frac{[Cl] \times [\text{Volume de água}]}{250}$

[3] Equação para concentração de células em amostras concentradas

Nº de células(ml) = nº total de células x  $5 \times 10^4$

[4] Equação para concentração de células em amostras diluídas

Nº de células(ml) =  $\frac{\text{nº total de células}}{4}$  x fator de diluição x  $10^4$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	GERAL .....	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO I.....	15
2.3	OBJETIVO ESPECÍFICO II .....	15
2.4	OBJETIVO ESPECÍFICO III.....	15
2.5	OBJETIVO ESPECÍFICO IV.....	15
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>16</b>
3.1	PREPARAÇÃO DAS CEPAS E MEIO DE CULTIVO INICIAL .....	16
3.2	INÓCULO EM ESGOTO DOMÉSTICO E AVALIAÇÃO DE CURVA DE CRESCIMENTO .....	18
3.3	PRODUTIVIDADE DA BIOMASSA E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES DO MEIO.....	20
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
4.1	CRESCIMENTO EM ESGOTO DOMÉSTICO, CONSUMO DE NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE .....	20
4.2	RENDIMENTO LIPÍDICO.....	24
4.2.1	Rendimento de biomassa e eficiência de remoção de compostos do cultivo.....	24
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alternativas para a geração de energia vem sendo estudadas com mais empenho nas últimas décadas, em função da alta demanda mundial de consumo de combustíveis fósseis, é uma temática que vem ganhando força à medida que se compreende do potencial poluidor e finitude deste tipo de combustível. Sendo assim, urge a procura de meios de produção de combustíveis que tenham potencial energético e representem também ganhos ambientais. O cultivo de microalgas para a produção de biodiesel criou força à medida que tecnologias voltadas a produção foram criadas e o entendimento a respeito da temática foi ampliado. O cultivo pode ocupar áreas que não são férteis ou agricultáveis, ser produzido a partir de água de descarte doméstico ou salobra, impróprias também para a agricultura. (Derner, 2016)

O cultivo de culturas alimentares, para produção de ração animal ou de uso industrial como milho, soja, dendê, cana de açúcar, palma, mamona, canola, algodão competem devido a necessidade de áreas agricultáveis férteis para sua produção. Estão associadas ao mercado mundial por serem commodities agrícolas. Muitas vezes necessitando de pesticidas e reforçam o sistema de cultivo *plantation*, onde grandes áreas são destinadas ao cultivo de uma única espécie vegetal. As microalgas possuem potencial lipídico elevado, podem ser cultivadas em efluente doméstico, não dependem de agrotóxico, não dependem de solo fértil. (Cornélio, 2021)

O cultivo de algas de forma controlada é normalmente realizado em sistemas abertos ou fotobiorreatores fechados em diversas escalas. Nesses sistemas o cultivo pode ser conduzido de modo a se obter ganhos no volume da biomassa, produtividade lipídica e a remoção dos nutrientes e matéria orgânica. A eficiência desta prática depende principalmente de: escolha da espécie a ser cultivada, condições de iluminação e do aporte de carbono e nutrientes, podendo assumir diferentes metabolismos para o cultivo. A microalga *Desmodesmus sp.* vem demonstrando resiliência a salinidade, temperatura, presença de toxinas e além de removerem altas taxas de nutrientes dissolvidos presentes em efluentes que podem ser utilizados no cultivo. (Knoshaug,*et. al.*, 2020).

A otimização dos sistemas de crescimento de algas a maximização da produção de triglicerídeos, fazem parte dos esforços necessários para tornar a produção do biocombustível a partir microalgas, mais sustentável. A dupla utilização do cultivo de microalgas, tanto para tratamento de águas residuais e para geração de biocombustível, é por conseguinte, uma opção atraente em termos de redução do custo de produção.

Neste sentido, a presente pesquisa, pretende promover o cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em efluente doméstico sob diferentes metabolismos energéticos, de

modo a determinar as formas para otimizar as taxas de crescimento, as concentrações de células em cultura, e assim, identificar condições de cultivo que promovam melhor produção de lipídeos intracelular, tornando a produção de biocombustível a partir de microalgas, mais sustentável economicamente e ambientalmente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a influência do fotoperíodo na produção de biomassa, lipídeos e remoção de nutrientes por microalgas cultivadas em esgoto doméstico.

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO I

Avaliar as curvas de crescimento das microalgas em diferentes metabolismos energéticos: Autotrófico, mixotrófico e heterotrófico.

### 2.3 OBJETIVO ESPECÍFICO II

Comparar o ganho de biomassa e lipídeos da espécie *Desmodesmus subspicatus* em diferentes condições de metabolização.

### 2.4 OBJETIVO ESPECÍFICO III

Avaliar a remoção de nutrientes presentes no esgoto doméstico por meio do metabolismo algal.

### 2.5 OBJETIVO ESPECÍFICO IV

Apontar possíveis metodologias e o custo benefício mais viável para a produção de biomassa algal visando a produção de biodiesel a partir deste produto, e tendo como consequência o tratamento de efluentes doméstico.

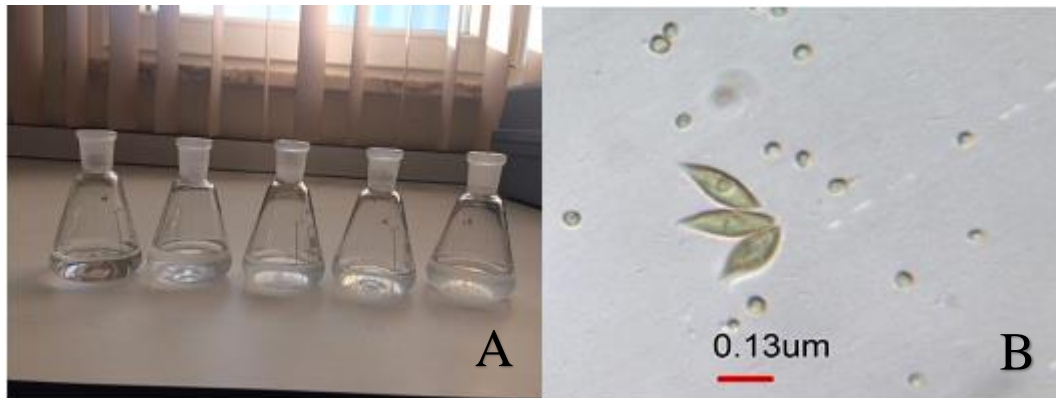
### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PREPARAÇÃO DAS CEPAS E MEIO DE CULTIVO INICIAL

As cepas da espécie *Desmodesmus subspicatus* foram cedidas pelo LAPAVI/ UFRPE (Laboratório de Produção de Alimento Vivo/ Universidade Federal Rural de Pernambuco), foram cultivadas até que obtivessem concentração adequada para repicagem, para que daí então fossem inoculadas nas amostras de água da lagoa de polimento de esgoto doméstico da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de Rio Formoso, situada no litoral Sul de Pernambuco.

As amostras foram coletadas da lagoa primária da ETE em período matutino, apesar de terem sido coletadas em época chuvosa da região, apresentaram características similares a aquelas encontradas em trabalhos prévios realizados datados da mesma sazonalidade, pelo fato de não ter havido chuvas de grande intensidade capazes de diluir o esgoto (Barbosa, 2013). Não foram detectadas células microalgais no efluente bruto que foi utilizado como meio de cultivo. As amostras foram armazenadas em bombonas com capacidade volumétrica de 20L e mantidas sob resfriamento. O cultivo inicial da *D. subspicatus*, para posterior repicagem em água de efluente doméstico, foi feito com uso de ágar-ágar específico para microalgas dulciaquícolas.

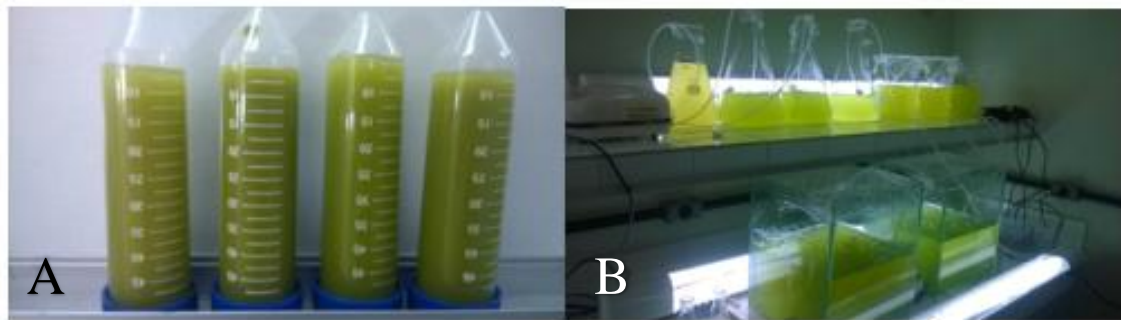
Figura 1 - (A) Efluente preparado aguardando inoculação (B) Imagem de microscópica de *D. subspicatus*



Após o preparo inicial das cepas de *D. subspicatus*, as células foram replicadas para volumes maiores em tubos de ensaio, tubos Falcon e Erlenmeyers com pequena capacidade volumétrica (Figura 2). Com a finalidade da realização da repicagem gradativa, faz-se necessário que as células estejam em sua fase de crescimento exponencial, ou seja com o crescimento sendo observado e mantido até que obtivesse com uma concentração de  $10^6$  cel/ml.



Figura 2 - (A) Tubos Falcon (B) Erlenmeyers, beckers e aquários utilizados na repicagem



Identificou-se essa fase, através da realização de contagens periódicas de células, fazendo o uso de uma Câmara de Neubauer (Figura 3), o processo de contabilização de células está descrito com maiores detalhes no item 3.2. Assim, para que as células se multiplicassem e atingissem a concentração ideal para repicagem, foram nutridas com meio de cultivo Provasoli (1958) adaptado com vitaminas do complexo B, na proporção de 1ml/L e 0,5ml/L do cultivo, respectivamente. (Tabela 1)

Esta promoção do ganho de biomassa ocorreu não apenas com a adição dos nutrientes, pois inicialmente 90% do volume total refere-se à água de abastecimento, foi destinada para o cultivo inicial por possuir sais minerais dissolvidos importantes para o metabolismo energético das microalgas. Foram utilizadas cepas de *D. subspicatus* que foi cedida pelo LAPAVI/UFRPE, que foram mantidas sob refrigeração em erlenmeyers, inoculadas em efluente bruto coletado na ETE Rio Formoso, este efluente por sua vez foi filtrado em sistema de sucção a vácuo utilizando lã de vidro como agente filtrante, clorado e posteriormente desclorado.

Tabela 1 - Composição do meio comercial Provasoli® com vitaminas do Complexo B.

Composição	Concentração
Meio comercial Provasoli®	
$H_3BO_3$	1,93g/L
$FeCl_3$	0,053g/L
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,273g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0367g/L
$CO_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0,008g/L
Solução de EDTA 0,5 M	11,4ml
Solução de vitaminas do Complexo B	
Biotina (B7)	0,01ml/L
Cianocobalamina(B12)	0,01ml/L

Fonte: Adaptado de Provasoli (1958)

O tratamento com cloro foi indicado como medida profilática, evitando desta maneira a contaminação da água com micro-organismos indesejados no cultivo de pequena escala, foi utilizado dióxido de cloro ( $ClO_2$ ) em concentração de 10ppm por litro. Portanto, temos:

[1] Equação para cálculo de volume de Cl a ser utilizado:

$$\text{Volume } H_2O \times 0,014.$$

Após a adição do cloro no volume de água desejado, para que fosse acelerada a volatilização do reagente na solução, aerou-se com bombas de aquário pelo tempo médio de 60 minutos e deixado em repouso por 24 horas. Para aferir a concentração de dióxido de cloro ( $ClO_2$ ) na solução, utilizou-se teste de piscina com o indicador de Orto-toluidina ( $CH_3C_6H_4NH_2$ ). A partir da aferição das concentrações de dióxido de cloro ( $ClO_2$ ), calculou-se a quantidade de tiosulfato de sódio ( $Na_2S_2O_3$ ) para desclorar a água e torna-la própria para o uso no cultivo. Para realização deste cálculo foi utilizada a seguinte equação:

[2] Equação para cálculo de quantidade de tiosulfato de sódio:

$$\text{Tiosulfato de Sódio} = \frac{[Cl] \times [\text{Volume de água}]}{250}$$

Onde a concentração de dióxido de cloro é multiplicada pelo volume de água, dividindo o valor obtido pela constante numérica.

### 3.2 INÓCULO EM ESGOTO DOMÉSTICO E AVALIAÇÃO DE CURVA DE CRESCIMENTO

Foi utilizado o esgoto doméstico bruto, coletado da ETE Rio Formoso, localizado no litoral sul de Pernambuco. Para promover a decantação das partículas sólidas grosseiras contidas no esgoto, foi previamente armazenado sob refrigeração por 24h em temperatura de 4°C. Antes de ser utilizado como meio, o esgoto foi caracterizado quanto as suas propriedades físico-químicas, tais como: pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade elétrica (CE), potencial de oxirredução, que foram realizadas *in loco*; sólidos suspensos totais, DQO (Demanda química de oxigênio), densidade de células microalgais e os nutrientes dissolvidos: Nitrogênio Total-NTK, N-amoniacoal, Fósforo (P) e Nitrito, realizadas no laboratório.

Alcançados volumes de 2L, o cultivo inicial foi transferido para esgoto doméstico, na proporção de 9:1, sendo nove partes de esgoto para uma parte de cultivo de microalga, deste modo 2L de cultivo para 18L de esgoto doméstico. A avaliação do crescimento microalgal, foi realizada por meio da contagem da concentração de células por ml de cultivo, obtida com o auxílio da câmara de Neubauer (Figura 2), a metodologia consiste em homogeneizar a

suspensão, goteja-la na câmara de Neubauer, cobrir a área adequada com uma lamínula, aguardar em média 02 (dois) minutos para que ocorresse a sedimentação das células na câmara, para por sua vez possa ser feita a contagem das células na amostra.

Nos casos em que a amostra estava concentrada realizou-se o somatório das células que se encontravam na diagonal principal do quadrante central da câmara (Figura 3A), porém nos casos em que ocorreu a diluição ou a amostra apresentou baixa concentrações de células por ml, o fator de correção da diluição foi levado em consideração ao realizar o cálculo (Figura 3B)

Assim temos:

Para amostras concentradas:

[3] Equação para concentração de células em amostras concentradas

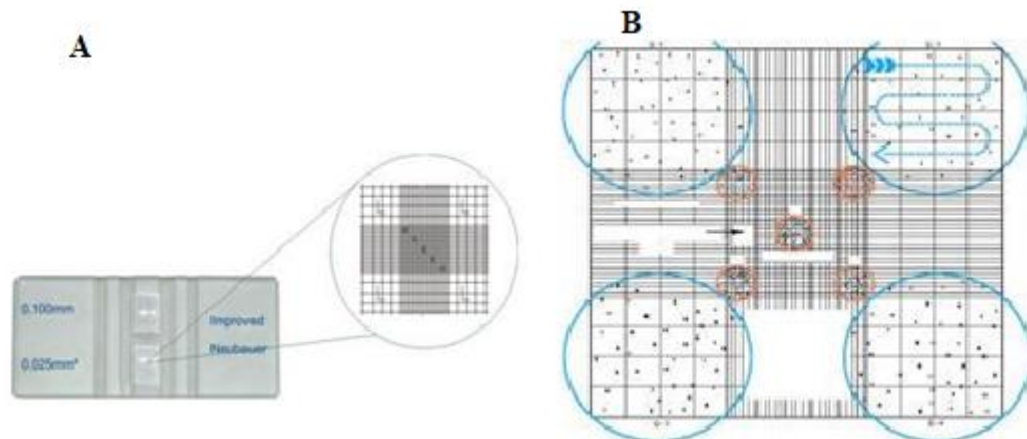
$$\text{N}^\circ \text{ de células(ml)} = \text{n}^\circ \text{ total de células} \times 5 \times 10^4$$

Para amostras diluídas:

[4] Equação para concentração de células em amostras diluídas

$$\text{N}^\circ \text{ de células(ml)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{4} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

**Figura 3 - (A) Câmara de Neubauer com quadrantes ampliados (B) quadrantes utilizados para contagem de amostras diluídas em evidência**



Fonte: Google images

Os cultivos mantiveram-se em aquários de vidro transparente, a uma temperatura de  $17 \pm 2^\circ\text{C}$ , para que a possibilidade de proliferação de fungos e bactérias fosse diminuída evitando que sobrepusessem o crescimento das algas. Para a homogeneização foi utilizada bomba de aquário com vazão de 2L de ar/min.. Foram aplicados três tipos de fotoperíodos, a partir da utilização de lâmpadas fluorescentes com 2000lumens de potência, sendo eles: o fototrófico

que foi submetido a luz contínua; o heterotrófico que não foi submetido a nenhum tipo de iluminação e mantido no escuro; e o mixotrófico, onde foi exposto a períodos alternados com 12h de luz e 12h sem iluminação, esse controle foi realizado através da utilização de timer.

### 3.3 PRODUTIVIDADE DA BIOMASSA E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE NUTRIENTES DO MEIO

A avaliação da produtividade da biomassa, em termos de rendimento (g/L) grama de biomassa por litro de cultivo, foi realizada através da metodologia de sólidos suspensos. A análise da eficiência de remoção de nutrientes foi feita diariamente no meio de cultivo, por meio da quantificação de nitrogênio amoniacal dissolvido, fósforo dissolvido e DQO (Demanda química de oxigênio), também foram realizadas três análises de DBO (Demanda bioquímica de oxigênio) ao longo dos 30 dias de cultivo que aconteceram no dia zero, 15º dia e no 30º dia. Todos os métodos foram avaliados de acordo com Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos a seguir são referentes aos três tipos de metabolismos em que o cultivo foi submetido, sendo eles: fototrófico, heterotrófico e mixotrófico; a repicagem ocorreu gradativamente até que fosse obtido o volume final de 20L de cultivo para cada metabolismo, a concentração do nº de células foi contabilizada diariamente.

### 4.1 CRESCIMENTO EM ESGOTO DOMÉSTICO, CONSUMO DE NUTRIENTES E PRODUTIVIDADE

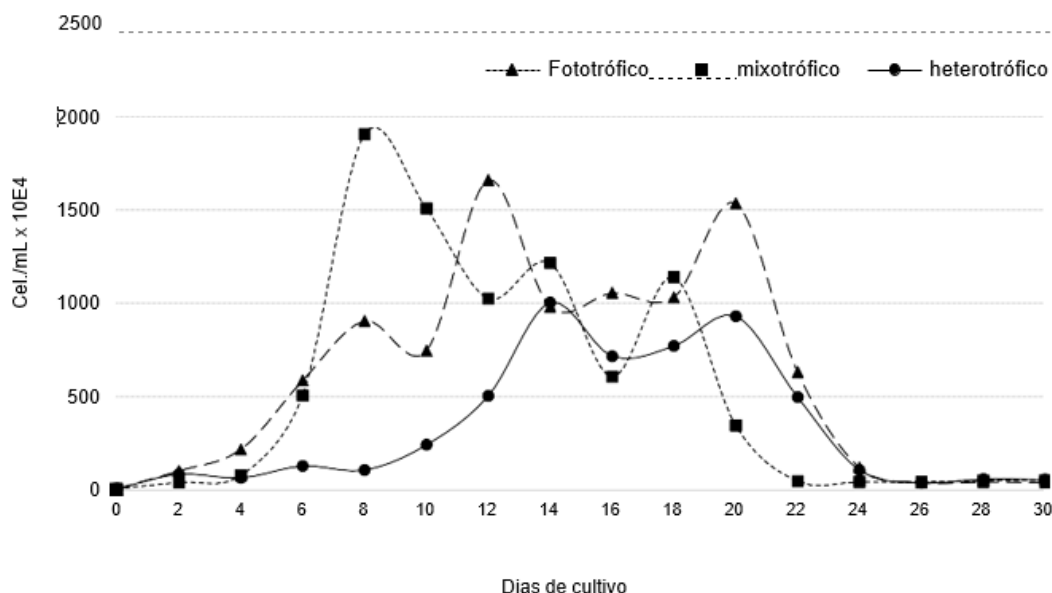
O esgoto doméstico utilizado para cultivo, foi previamente caracterizado quanto as suas propriedades físico-químicas e biológicas, como visto na (Tabela 2).

**Tabela 2 - Características físico-químicas e biológicas do efluente bruto usado como meio de cultivo.**

NTK	N-amon. dissolv.	P Dissolv.	Nitrito	DBO solúvel	Cor	pH	CE	Densidade celular
44,36 mg/L	31,45±2 mg/L	3,01 mg/L	0,3 mg/L	165±12 mgO <sub>2</sub> /L	21 NTU	7,35	1010 µS/cm	ND

Curva de crescimento foram elaboradas ao longo de 30 dias de cultivo para que fosse avaliado o comportamento da espécie em diferentes tipos de cultivo (Gráfico 1).

**Gráfico 1 - Curvas de crescimento de *D. subspicatus* em metabolismo (▲)fototrófico, (■)mixotrófico e (●)heterotrófico ao longo dos 30 dias de cultivo**



A curva de crescimento foi avaliada por meio de aspectos qualitativos e quantitativos das células em suspensão. Para elaboração da curva, foram qualificadas as células viáveis, ou seja, aquelas que apresentam turgescência e formas.

Nota-se que o crescimento se comportou de forma similar nos 3 tipos de cultivo, havendo mais de um pico de crescimento em diferentes períodos para cada um dos metabolismos. O cultivo sob metabolismo fototrófico, com iluminação contínua, apresentou três picos de crescimento, que ocorreram no 8º, 13º e 21º dia. O primeiro pico do cultivo fototrófico coincidiu com o do cultivo mixotrófico, entretanto o número de células totais do cultivo fototrófico se mostrou inferior que o mixotrófico, que recebeu luz por período de tempo inferior (12h).

Essa concentração inferior de células contabilizadas, pode ser explicada pela condição que as microalgas foram sujeitas, favorecendo um intenso metabolismo pela intensa iluminação. Chisti (2007) explica que a luz também pode atuar como fator inibitório a multiplicação das microalgas, ao passo que pode levar a uma condição de estresse. Desta forma, este aspecto pode ser atribuído ao fato das microalgas deste cultivo terem mostrado um crescimento aquém ao cultivo realizado mixotroficamente, com 12h de luz diária.

Os cultivos mixotrófico e heterotrófico, apresentaram dois picos de crescimento, sendo o heterotrófico mais tardio que os demais. Os picos de crescimento dos cultivos, foram acompanhados pelo acréscimo de nutrientes N-amoniacoal e o fósforo dissolvido no meio. Ao passo que a densidade microalgal aumentava, as concentrações de nutrientes seguiam um padrão semelhante. Os (Gráfico 2), (Gráfico 3) e (Gráfico 4) mostram o comportamento desses nutrientes nos cultivos.

Gráfico 2 - Comportamento das concentrações de N-amoniacoal e fósforo dissolvido no cultivo Fototrófico

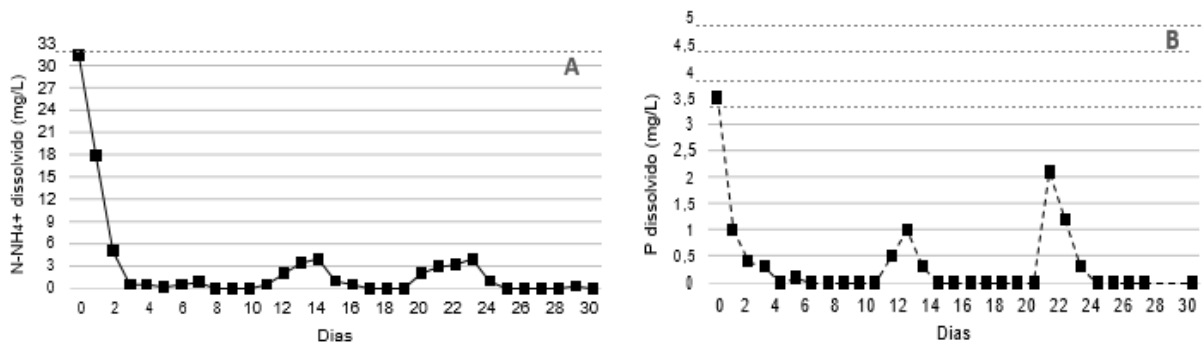


Gráfico 3 - Comportamento das concentrações de N-amoniacoal e fósforo dissolvido no cultivo Mixotrófico

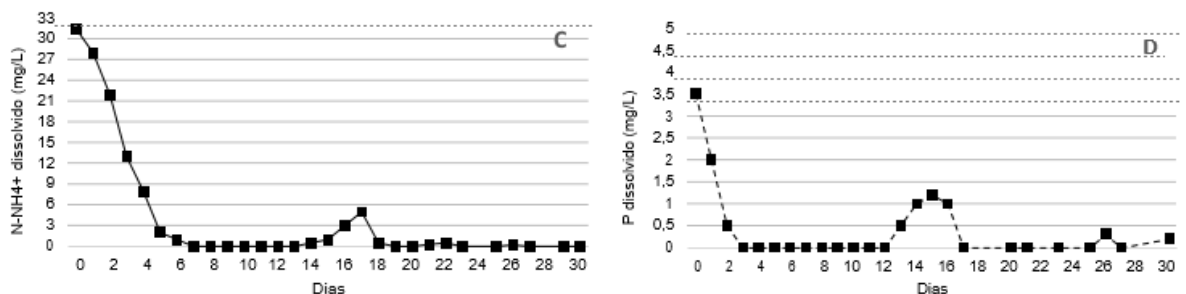
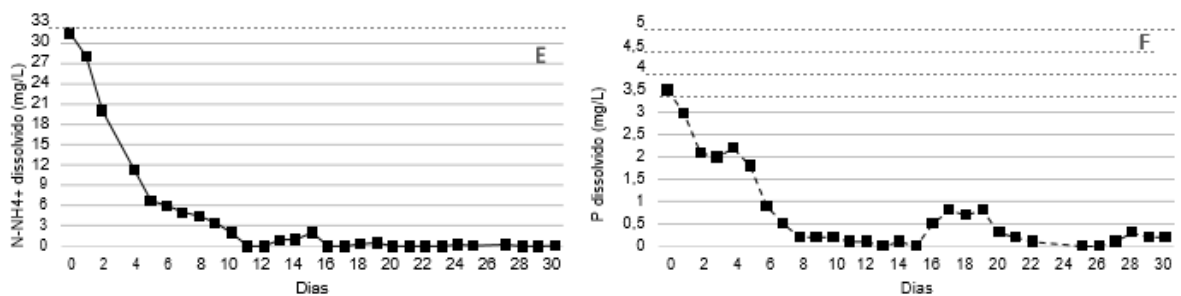


Gráfico 4 - Comportamento das concentrações de N-amoniacoal e fósforo dissolvido no cultivo Heterotrófico

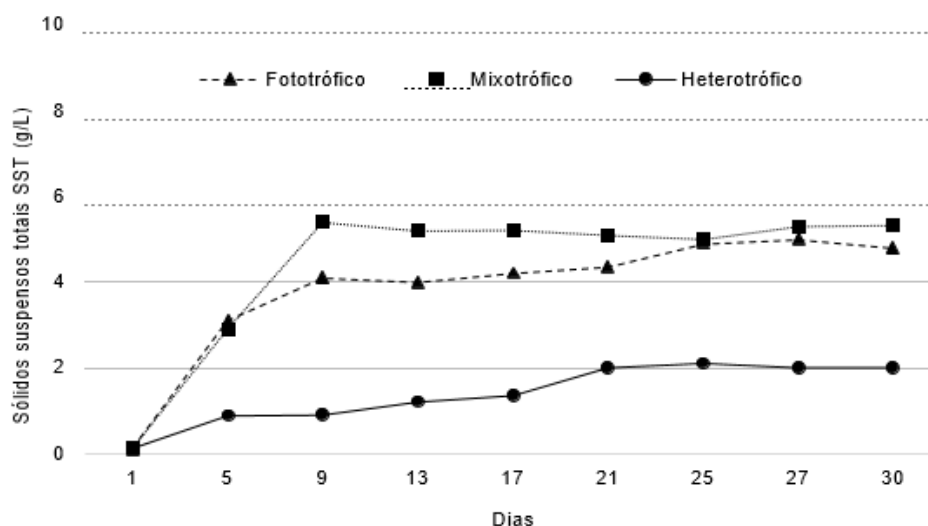


Os nutrientes foram completamente depletados do meio entre o 4º e 6º dia de cultivo, com exceção do cultivo sob metabolismo heterotrófico, que levou 8 e 10 dias para consumir

todo fósforo e N-amoniacoal, respectivamente. Vale ressaltar que os períodos em que as células se mostraram em comportamento de pico, também foram acompanhados por um leve crescimento de nutrientes no meio.

Tal fato pode ser explicado pela morte da biomassa de algas após consumo de nutrientes disponíveis no meio de cultivo, e a consequente mineralização de sua matéria orgânica pelas bactérias presentes no esgoto doméstico e assim, fornecendo nutrientes para o meio. Por essa razão, os cultivos obtiveram picos e quedas de densidade, ao passo que a concentração de nutrientes aumentava e diminuía de modo paralelo, porém não proporcional. (Gráficos 1 a 4)

**Gráfico 5 - Sólidos suspensos totais ao longo do período de monitoramento**

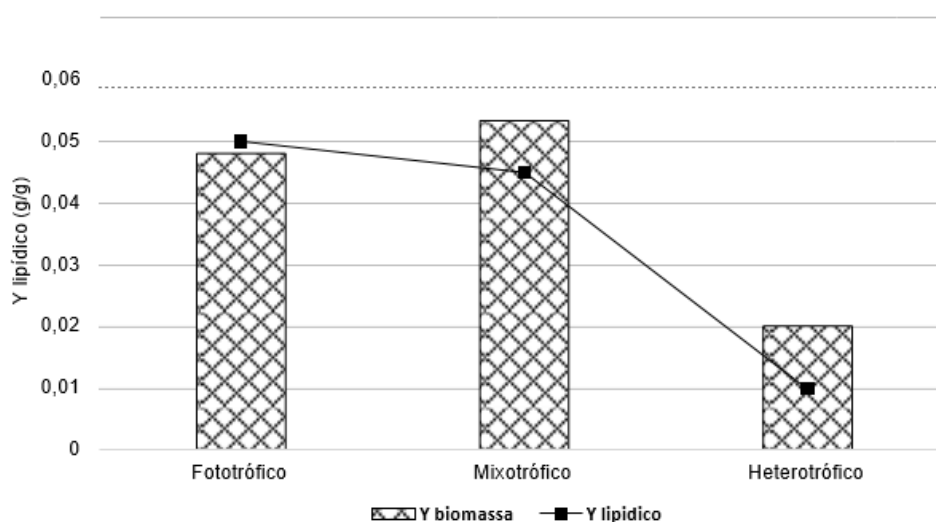


No Gráfico 5, é possível avaliar o rendimento total médio dos três cultivos atuando em diferentes metabolismos, sendo o maior rendimento observado no cultivo mixotrófico. Os rendimentos de biomassa foram medidos ao longo dos dias de cultivo. Para os três cultivos houveram período de crescimento exponencial de ganho de biomassa, um período estacionário mesmo com a curva de crescimento apresentando picos. Isso é explicado pelo fato de que a análise considerou todos os sólidos em suspensão, ou seja, tanto as células viáveis e as não viáveis. O crescimento fototrófico e mixotrófico comportaram-se de modo semelhante quanto ao rendimento da biomassa ao longo dos dias. Já o heterotrófico foi lento, e seu rendimento esteve muito aquém dos demais cultivos, isto pode estar associado a menores concentrações de fósforo dissolvido ao longo do cultivo, ausência de iluminação necessária para melhor desempenho na captura de carbono disponível no meio.

## 4.2 RENDIMENTO LIPÍDICO

Ao avaliar o conteúdo lipídico total mostra que, embora o conteúdo da biomassa do cultivo mixotrófico tenha apresentado maior volume, foi a biomassa proveniente do cultivo fototrófico que teve um rendimento lipídico levemente maior. Isto foi associado à condição de estresse nutricional enfrentado pelo cultivo autotrófico devido a sua maior exposição a luz.

Gráfico 6 - Rendimento lipídico e da biomassa obtido ao longo do período de cultivo



Bahadar e Kahan (2013), sugerem que para que o cultivo heterotrófico seja eficiente, em termos de ganho de biomassa, é necessário que seja adicionado ao cultivo uma fonte de carbono que se torne mais bio disponível para células, ou mesmo que utilizado um meio de cultivo contendo tais substâncias, como é o caso da glicose, glicerol entre outros.

A fonte de carbono normalmente encontrada em esgotos domésticos, são os carbonatos e uma pequena parcela de glicose (MATA *et al*, 2010). Ainda assim, foi possível obter uma biomassa significativa a partir do cultivo mixotrófico, no entanto, com menor teor lipídico total quando comparado ao cultivo fototrófico.

### 4.2.1 Rendimento de biomassa e eficiência de remoção de compostos do cultivo

Os cultivos responderam de forma diferente quanto a produção e o rendimento de biomassa, os resultados mostrados no Gráfico 6, indicam maior produção de biomassa para o



cultivo mixotrófico, seguido pelo cultivo fototrófico e o heterotrófico sendo o metabolismo com menor produção de biomassa.

Entretanto, quanto a produção lipídica, o tipo de cultivo fototrófico que ficou exposto por maior período de iluminação, apresentou maior concentração. Sendo o fator exposição a luz item de destaque para melhor desempenho da *D. subspicatus*. A maior concentração de células encontrada entre os diferentes metabolismos foi o do cultivo mixotrófico, seguido pelo cultivo fototrófico, sendo o cultivo heterotrófico com menor concentração de células. (Tabela 3).

**Tabela 3 - Densidade celular média e Biomassa total**

Tipo de metabolismo de cultivo de <i>D. subspicatus</i>	<i>DCM</i> <i>cel. 10<sup>4</sup></i>	Biomassa total <i>g. L<sup>-1</sup></i>
Fototrófico	1655	3,01
Mixotrófico	2010	3,05
Heterotrófico	1225	1,3

Já os dados referentes a caracterização do efluente após os cultivos, apresentaram os seguintes parâmetros (Tabela 4).

**Tabela 4 - Eficiência de remoção de compostos presentes no efluente (%)**

Tipo de metabolismo de cultivo de <i>D. subspicatus</i>	DBO <i>mg. O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup></i>	<i>N – NH<sub>4</sub><sup>+</sup>mg.L<sup>-1</sup></i>	<i>P – PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>mg.L<sup>-1</sup></i>
Fototrófico	45	100	100
Mixotrófico	58	100	94
Heterotrófico	30	99	94

Os três cultivos apresentaram resultados muito similares, mostrando a remoção da amônia em sua totalidade. Os cultivos mixotrófico e heterotrófico apresentaram a mesma capacidade para remoção do fosfato encontrado no efluente. Quanto a alteração na demanda bioquímica de oxigênio o cultivo mixotrófico demonstrou melhor desempenho, seguido do cultivo fototrófico. O cultivo heterotrófico desempenhou menor rendimento em relação a remoção de amônia, fosfato e para o DBO, entretanto, ainda assim possui potencial positivo para remoção de compostos em efluente doméstico.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cultivo mixotrófico representou melhores rendimentos em relação a produção lipídica, densidade celular média, aproveitamento de biomassa e remoção de compostos presentes no efluente, o cultivo fototrófico vem em seguida apresentando rendimento similar quanto a biomassa total e rendimento superior quando comparado a produção lipídica. Já o cultivo heterotrófico, apesar de ter apresentado diferença sutil em relação a DCM (densidade celular média) foi o tipo de metabolismo que apresentou menor aproveitamento de biomassa.

Sendo assim, as curvas de crescimento da espécie *D. subspicatus* obteve melhor resultado, em relação a quantidade de células e eficiência do uso do meio de cultivo, quando cultivada sob metabolismo mixotrófico, no entanto, resultados muito similares também foram vistos sob o metabolismo fototrófico. Sendo o metabolismo heterotrófico o menos produtivo.

Quanto a remoção de compostos no efluente utilizado, se mostrou de forma positiva para os três tipos de cultivo, apresentando melhores resultados para a remoção de amônia, em seguida para o fosfato. Em todos os cultivos DBO apresentou diminuição da demanda bioquímica superiores a 30% em relação a demanda anteriormente analisada no efluente bruto. Os três tipos de metabolismos apresentaram eficácia para remoção e redução de compostos presentes na água de efluente doméstico.

## REFERÊNCIAS

- APHA-AWWA-WPCF (1995). **Standard methods for the examination of water and wastewater**, APHA, Washington, 1691 p
- BAHADAR, A., & BILAL KHAN, M. (2013). **Progress in energy from microalgae: a review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 27:128–148.
- CORNÉLIO, J. P. de S.. (2021). **Microalgas: uma alternativa sustentável para produção de biodiesel no brasil**. *Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente*, 2(3), 52. <https://doi.org/10.51189/rema/2074>
- CHISTI, Y. (2007). **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnology Advances*. 25 (3), 294–306.
- DEMIRBAS, A. (2011). **Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems**. *Applied Energy*. 88 (10), 3541–3547.
- DERNER, R. B; *Biotechnologia de algas. Microalgas e a produção de biocombustíveis: situação atual*. *Aquaculture*. Set/out. (2016).
- LI, Y.; CHEN, *et al*. **Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production**. *Bioresource Technology*. (2011). 102(8), 5138–44.
- Knoshaug, Eric P.; **Draft Genome Sequence of the Biofuel-Relevant Microalga *Desmodesmus armatus***. *ASM Journals. Microbiology Resource Announcements*. Vol. 9, nº 6. Feb. (2020) <https://doi.org/10.1128/mra.00896-19>
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. (2010). **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14 (1), 217–232.
- MOLINA, G. E.; *et al*. **Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics**. *Biotechnology Advances*. (2003). 20:491–515.