

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**TRATAMENTO DE EFLUENTES DE
CURTUME COM CONSÓRCIO DE
MICROALGAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALINE DE CÁSSIA CAMPOS PENA

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**TRATAMENTO DE EFLUENTES DE
CURTUME COM CONSÓRCIO DE
MICROALGAS**

ALINE DE CASSIA CAMPOS PENA

Dissertação de Mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química

Área de Concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos

Orientadora: Profa. Dra. Mariliz Gutterres

**Co-orientadora: Profa. Dra. Luciane
Ferreira Trierweiler**

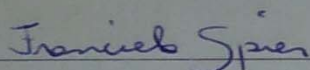
PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

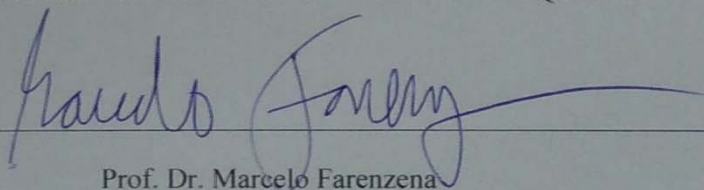
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação Tratamento de Efluentes de Curtume com um Consórcio de Microalgas, elaborado por Aline de Cassia Campos Pena, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Comissão Examinadora:



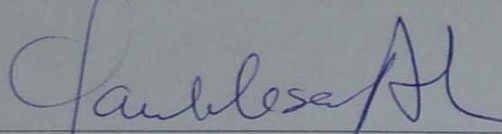
Dr.^a Franciela Spier

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – DEQUI



Prof. Dr. Marcelo Farenzena

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - DEQUI



Prof. Dr. Paulo Cesar Oliveira Vergne de Abreu

Universidade Federal do Rio Grande– IO

Aos meus pais André (in memoria) e Edith

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho em especial minha gratidão:

À Deus por iluminar meu caminho e sempre me proteger.

À toda minha família, em especial a minha mãe Edith, ao meu pai André (in memória) e meu irmão Alexandre, por sempre me apoiarem e incentivarem para que pudesse alcançar meus objetivos.

À professora Mariliz Gutterres, não só pela orientação, mas pelo carinho, dedicação e ensinamentos transmitidos ao longo deste período.

À professora Luciane Trierweiler pela co-orientação e pela grande colaboração neste trabalho.

À Juliana Tolfo e Nelzy pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do LACOURO pelas convivências diárias e ensinamentos. Crislaine, Bianca, Caroline, Juliana, Juliana, Jaqueline, Franciela, Brunna, Santiago, Manoel, Eduardo, Guilherme, Amanda, Lívia, Marina, Taysnara, Daniela, João e Ana Paula.

À UFRGS e ao Departamento de Engenharia Química, pela estrutura oferecida.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos que fiz ao longo desta jornada em especial à Crislaine, Manoel, Anne Caroline, Amanda e Francisco.

Os amigos de sempre, que mesmo longe serviram de inspiração e estão sempre torcendo por mim: Adriana, Thais e Lucas.

RESUMO

Os efluentes líquidos de curtumes apresentam altas cargas orgânicas e de poluentes que devem ser tratados corretamente para atingir os padrões legais para seu descarte, evitando a eutrofização de corpos hídricos e poluição das águas. O acabamento do couro é o estágio final da produção, onde o couro recebe as características desejadas de acordo com os produtos e artigos que serão produzidos. Os efluentes das etapas de processamento para acabamento do couro são responsáveis por conterem poluentes químicos devido ao uso de corantes, surfactantes, metais tóxicos, agentes emulsificantes, recurtentes, óleos, pigmentos, resinas, entre outros produtos químicos adicionados. As microalgas têm sido alvo de vários estudos no âmbito de tratamento de efluentes, devido à sua capacidade de remover diversos nutrientes, matéria orgânica do meio e por serem formas mais limpas e econômicas de tratar os poluentes. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego de um consórcio de microalgas para tratamento de efluentes de um curtume e analisar a capacidade de remoção de poluentes que são nutrientes para estes microrganismos. Os efluentes foram caracterizados ao longo dos ensaios com o consórcio de microalgas por meio de Nitrogênio Total (NT), Amônia (NH_3), Fósforo (P-PO_4), Carbono total (CT), Carbono Orgânico Total (COT), Carbono inorgânico (CI), DQO e Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e foi acompanhado o crescimento das microalgas. Para os experimentos foram coletados efluentes em três estágios distintos em uma estação de tratamento: efluente bruto (B), efluente após tratamento primário de coagulação/floculação (P) e efluente após ao tratamento biológico secundário (S). Os resultados com concentração de efluente de 50%, diluídos em água destilada (A), após 16 dias de cultivo, mostraram que houve crescimento do consórcio nos três efluentes com um crescimento máximo de $1,77 \text{ g L}^{-1}$ no efluente Bruto (50B50A). Na sequência, foi testado o cultivo em efluente bruto (100B) e em efluentes compostos nas seguintes proporções: 50% efluente bruto + 50% efluente após tratamento biológico (50B50S) e 25% efluente bruto + 75% efluente após tratamento biológico (25B75S). Foi possível cultivar o consórcio no efluente bruto sem diluição, entretanto os resultados foram ruins, pois o mesmo apresentou baixo crescimento e, conseqüentemente, baixos níveis de remoção de nutrientes. Com o efluente composto 25B75S percebeu-se morte rápida das microalgas, uma vez que o efluente apresentava baixas concentrações de nutrientes. Em contrapartida, no efluente 50B50S foram atingidos valores efetivos de crescimento e remoção de nutrientes. Em cultivos fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico de efluente composto 50B50S e de 75% efluente bruto + 25% efluente após tratamento biológico (75B25S), os melhores resultados foram atingidos no efluente 75B25S no cultivo fotoautotrófico, crescendo até $1,42 \text{ g L}^{-1}$ e atingindo valores de remoção de N-NH_3 , Nitrogênio Total (NT), DQO, carbono orgânico total (TOC) e demanda biológica de oxigênio (DBO_5), de 99,90%, 74,89%, 56,70%, 58,18% e 20,68%, respectivamente. Ao obter a microalga isolada *Tetraselmis sp.* predominante no consórcio foi analisado os parâmetros anteriores em cultivo fotoautotrófico, além disso foi verificada a quantidade de lipídio presente na biomassa. A microalga *Tetraselmis sp.* apresentou um crescimento notório no cultivo fotoautotrófico com remoções eficientes dos parâmetros e 5,0% de lipídio no peso seco.

Palavras-chave: *Tetraselmis sp.*, efluente de curtume, remoção de nutrientes

Abstract

Liquid effluents from tanneries present high organic and pollutant loads and must be treated correctly to meet the legal standards for effluent disposal and to avoid eutrophication of water bodies and water pollution. The leather finish is the final stage of production, where the leather receives the desired characteristics according to leather goods and articles. The effluents from the processing steps for leather finishing are responsible for containing chemical pollutants due to the use of dyes, surfactants, toxic metals, emulsifying agents, retanning agents, oils, pigments, resins, among other chemicals added. Microalgae have been the subject of several studies in the field of effluent treatment due to their ability to remove various nutrients, organic matter from the environment and to be cleaner and more economical ways to treat pollutants. In this work, the growth of a microalgae consortium for the treatment of effluents from a tannery was analyzed and the capacity of removal of Total Nitrogen (NT), Ammonia (NH₃), Phosphorus (P-PO₄), Total Carbon), Total Organic Carbon (COD), COD and Biological Oxygen Demand (DBO), as well as the growth of microalgae biomass in these effluents. The effluents were characterized before and after the trials with the microalgae consortium. Effluents were collected in three distinct stages at a treatment plant: crude effluent (B), effluent after primary coagulation / flocculation (P) treatment and effluent after secondary biological treatment (S). The results with 50% effluent concentration, diluted in distilled water (A) after 16 days of cultivation, showed that there was a consortium growth in the three effluents with a maximum growth of 1.77 g L⁻¹ in the crude effluent (50P50A). (50B50S) and 25% crude effluent + 75% effluent after biological treatment (25B75S) were tested in the following proportions: 50% crude effluent + 50% effluent after biological treatment (50B50S). It was not possible to cultivate the consortium in pure crude effluent, since it presented low growth and, consequently, low levels of nutrient removal. With the compound effluent 25B75S it was observed rapid death of the microalgae, since the effluent presented low concentrations of nutrients. On the other hand, in the effluent 50B50S, effective values of growth and nutrient removal were achieved. In photoautotrophic, mixotrophic and heterotrophic cultures of 50B50S effluent and 75% crude effluent + 25% effluent after biological treatment (75B25S), the best results were reached in the effluent 75B25S in photoautotrophic cultivation, growing up to 1.42 g L⁻¹ and reaching values of removal of N-NH₃, total nitrogen (NT), (DQO), total organic carbon (COT) and biological oxygen demand (DBO), of 99.90%, 74.89%, 56.70%, 58.18% and 20.68%, respectively. By obtaining the isolated microalgae *Tetraselmis sp.*, predominant in the consortium and analyzed and the previous parameters in photoautotrophic cultivation, in addition to being verified the amount of lipid present in the biomass. The microalgae *Tetraselmis sp.* showed a notable growth in photoautotrophic cultivation with efficient removal of the parameters and 5.0% of lipid in dry weight.

Keywords: Microalgae, tannery effluent, nutrient removal.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS DA PESQUISA	3
1.2 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA	4
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. MICROALGAS	6
2.1.1 <i>Classificação</i>	7
2.1.2 <i>Lipídios, proteínas, carboidratos e aplicações</i>	9
2.1.3 <i>Fatores que influenciam no crescimento.....</i>	9
2.1.3.1 <i>Luminosidade</i>	10
2.1.3.2 <i>Temperatura</i>	10
2.1.3.3 <i>pH.....</i>	11
2.1.3.4 <i>Agitação.....</i>	11
2.1.3.5 <i>Tipos de cultivo</i>	11
2.1.4 <i>Isolamento</i>	13
2.2 INDÚSTRIA DO COURO	13
2.2.1 <i>Processamento do couro</i>	14
2.2.2 <i>Acabamento molhado e acabamento final</i>	14
2.3 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL APLICADA AOS EFLUENTES LÍQUIDOS	16
2.4 TRATAMENTO DE EFLUENTES DE CURTUME	17
2.5 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS	18
2.6 TRATAMENTO DE EFLUENTES COM CONSÓRCIOS DE MICROALGAS.....	19

2.7	TRATAMENTO DE EFLUENTES DE CURTUME COM MICROALGAS	19
	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	CONSÓRCIO DE MICROALGAS	22
3.1.1.	<i>Coleta e manutenção do Consórcio</i>	22
3.1.2.	<i>Isolamento e Identificação da Microalga Predominante</i>	23
3.2	ETE E EFLUENTES COLETADOS	24
3.3.	EXPERIMENTOS DE CULTIVOS EM EFLUENTES	26
3.3.1.	<i>Testes dos efluentes</i>	26
3.3.2	<i>Cultivo em diferentes composições dos efluentes</i>	27
3.3.3	<i>Avaliação dos tipos de cultivo quanto a disponibilidade de luz</i>	28
3.3.4.	<i>Cultivo fotoautotrófico com a microalga isolada</i>	29
3.4	DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA	29
3.5	ANÁLISES DOS EFLUENTES	30
3.5.1	<i>pH</i>	31
3.5.2	<i>Determinação de Amônia</i>	31
3.5.3	<i>Determinação de fósforo</i>	31
3.5.4	<i>Análise de DBO e DQO</i>	31
3.5.5	<i>Determinação de carbono e nitrogênio total</i>	32
3.5.6	<i>Determinação da quantidade de lipídios na biomassa</i>	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	<i>Teste dos efluentes</i>	34
4.2	<i>Avaliação dos tipos de cultivo quanto a disponibilidade de luz</i>	40
4.2.1	<i>Cultivo Fotoautotrófico</i>	40
4.2.3	<i>Cultivo Mixotrófico</i>	46
4.2.4	<i>Cultivo Heterotrófico</i>	51

4.3	<i>Isolamento e identificação</i>	56
4.3.1	<i>Cultivo fotoautotrófico com a microalga isolada</i>	57
4.3.2	<i>Quantificação de lipídios</i>	62
CONCLUSÃO		64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		66

Lista de figuras

Figura 1. <i>Tetraselmis chuii</i> e <i>Tetraselmis suecica</i> (Bunthawin et al., 2011; Baker, 2012)	8
Figura 2. Etapa de isolamento e purificação da microalga predominante. a) diluição sucessiva e b) plaqueamento	23
Figura 3. Diagrama do processo de tratamento de efluente do curtume com indicação das coletas dos efluentes B, P e S.....	24
Figura 4. Efluentes de curtume: bruto (B), após a coagulação/floculação (P), amostra, após o tratamento biológico de lodos ativados (S).....	26
Figura 5. Efluentes 50B50A, 50P50A e 50S50A após a adição do pré-inóculo	27
Figura 6. Cultivo em meio TAP, 25B75S, 50B50S e 100B (da direita para a esquerda)28	
Figura 7. Cultivo fotoautotrófico com os efluentes compostos 50B50S e 75B25S em duplicatas.....	29
Figura 8. Curva de calibração com dados de medidas diretas de crescimento.....	30
Figura 9. Cultivos de microalgas após 16 dias nos efluentes 50B50A, 50P50A e 50S50A colocados da esquerda para a direita.....	35
Figura 10. Crescimento médio de microalgas em efluentes de curtumes 50B50A, 50P50A e 50S50A.....	36
Figura 11. Variação do pH nos efluentes diluídos 50B50A, 50P50A e 50S50A durante 16 dias	37
Figura 12. Biomassa microalgal durante o cultivo do consórcio em mio TAP.....	38
Figura 13. Crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo em efluentes 100B, 50B50S e 25B75S.	39
Figura 14. Crescimento médio do consórcio de microalgas em cultivo fotoautotrófico em efluentes de curtume nas composições 50B50S e 75B25S.....	41
Figura 15. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico para o efluente composto 50B50S	43
Figura 16. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico para o efluente composto 75B25S	43
Figura 17. Remoção de Nitrogênio ao longo do cultivo fotoautotrófico	44
Figura 18. Remoção de Amônia ao longo do cultivo fotoautotrófico	45
Figura 19. Remoção de Fósforo ao longo do cultivo fotoautotrófico	46
Figura 20. Crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo mixotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S.....	47
Figura 21. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo mixotrófico.....	49
Figura 22. Remoção de Amônia ao longo do cultivo mixotrófico	49
Figura 23. Remoção de fósforo ao longo do cultivo mixotrófico	50
Figura 24. Remoção de Carbono ao longo do cultivo mixotrófico para o efluente composto 50B50S	51
Figura 25. Remoção de Carbono ao longo do cultivo mixotrófico para o efluente composto 75B25S	51

Figura 26. Curva de crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo heterotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S	52
Figura 27. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo heterotrófico.....	54
Figura 28. Remoção de amônia ao longo do cultivo heterotrófico	54
Figura 29. Remoção de fósforo ao longo do cultivo heterotrófico.....	55
Figura 30. Remoção de Carbono ao longo do cultivo heterotrófico na composição de 50B50S.....	56
Figura 31. Remoção de Carbono ao longo do cultivo heterotrófico na composição de 75B25S.....	56
Figura 32. Consórcio de microalgas (aumento de 10x); B) Microalga isolada (aumento microscópico de 40x)	57
Figura 33. Crescimento da microalga <i>Tetraselmis</i> sp. durante 19 dias de cultivo fotoautotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S.....	58
Figura 34. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	60
Figura 35. Remoção de Amônia ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	60
Figura 36. Remoção de Fósforo ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	61
Figura 37. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico 50B50S com a microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	62
Figura 38. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico 75B25S com a microalga <i>Tetraselmis</i> sp.....	62

Lista de tabelas

Tabela 1. Visão geral da classificação da microalga Tetraselmis	8
Tabela 2. Temperaturas usadas no cultivo de Tetraselmis	11
Tabela 3. Características das condições dos cultivos Fotoautotrófico, Heterotrófico e Mixotrófico.	12
Tabela 4. Produtos químicos empregados por etapa de processamento do couro.....	16
Tabela 5. Formas de tratamento biológico de águas residuais da indústria do couro	18
Tabela 6. Composição do meio de cultivo TAP utilizado para a manutenção do consórcio de microalgas.	22
Tabela 7. Fósforo (P-PO ₄), Nitrogênio total (NT) e Amônia (N-NH ₃) dos efluentes B, P e S diluídos antes e após o tratamento com microalgas.	36
Tabela 8. Parâmetros médios dos efluentes 25B75S, 50B50S e 100B, antes e após o tratamento com microalgas durante 19 dias.....	40
Tabela 9. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25S antes e após o cultivo fotoautotrófico com o consórcio de microalgas.	42
Tabela 10. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25A antes e após o cultivo mixotrófico com a microalgas isolada.	48
Tabela 11. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25A antes e após o cultivo heterotrófico com o consórcio de microalgas.	53
Tabela 12. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25S antes e após o cultivo fotoautotrófico com o a microalgas Tetraselmis sp..	59
Tabela 13. Quantificação de lipídios na biomassa da microalga Tetraselmis sp. em cultivo fotoautotrófico ao final do cultivo.....	63

Lista de abreviaturas

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

ABS – Absorbância

B – Efluente Bruto

CI – Carbono inorgânico

COT – Carbono orgânico total

CT – Carbono total

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

DQO – Demanda química de oxigênio

ETE – Estação de tratamento de efluente

LACOURO – Laboratório de estudos em couro e meio ambiente

NT – Nitrogênio total

NTK – Nitrogênio total Kjeldahl

N-NH₃ – Amônia

P – Efluente após o tratamento de coagulação/floculação

P-PO₄ – Fósforo

T – Efluente após o tratamento secundário

UV – Ultravioleta

50B50A – 50% de efluente bruto e 50% de água destilada

50P50A – 50% de efluente após o tratamento de coagulação/floculação e 50% de água destilada

50S50A – 50% de efluente após o tratamento secundário e 50% de água destilada

25B75S – 25% de efluente bruto e 75% de efluente após o tratamento secundário

50B50S – 50% de efluente bruto e 50% de efluente após o tratamento secundário

75B25S – 75% de efluente bruto e 25% de efluente após o tratamento secundário

100B – 100% de efluente bruto

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

No cenário brasileiro a indústria de couro é um setor notório da economia. De acordo, com os dados apresentados em 2017, pela Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), o País é o segundo maior produtor de couro do mundo. No ano de 2016, o Brasil exportou 32.267.363 unidades de couro bovino entre pele salgada, wet-blue e couro acabado, a matéria prima acabada foi a principal forma de exportação do couro, correspondendo a 56,1% do total. O Estado do Rio Grande do Sul ofereceu a maior contribuição destas exportações, com 21,1% do total, seguido por São Paulo com 20,9% e Goiás em terceiro, com 14,9% (ABQTIC, 2017).

Na maioria das etapas de produção do couro, a água limpa é utilizada como veículo de difusão dos produtos químicos e extração de materiais indesejáveis da pele. Desta forma, os efluentes líquidos gerados tanto na etapa de ribeira, quanto de curtimento e acabamento, apresentam alto impacto no meio ambiente devido a altas concentrações de nitrogênio orgânico, fósforo, metais tóxicos, sulfetos, alta demanda biológica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e altas concentrações de sólidos suspensos. Assim, por se tratar de grandes volumes gerados com alta carga química, essa prática atrai grande atenção às técnicas de gestão dos resíduos produzidos, pois precisam de tratamentos adequados antes de serem descartados nos corpos hídricos (GUTTERRES *et al.*, 2015; SHARMA & MALAVIYA, 2016). As características das águas residuais de curtume variam amplamente, dependendo da natureza do

processo de curtimento adotado, da quantidade de água utilizada, do processo de preservação do couro e das medidas adotadas pela indústria para reduzir a poluição.

No estágio de acabamento, o couro wet-blue recebe as características finais desejadas, tais como resistências físico-mecânicas, suavidade, cor, durabilidade, estampagem e revestimento de superfície. O acabamento do couro consiste de etapas de: acabamento molhado (de desacidulação, recurtimento, tingimento e engraxe), secagem, pré-acabamento e acabamento. Nestas etapas vários compostos químicos são empregados no processamento, tais como recurtentes, agentes desacidulantes, corantes, óleos, surfactantes, polímeros, pigmentos, solventes, resinas e outros produtos químicos, além de matéria orgânica inerente ao processo, acarretando nas contaminações dos efluentes que requerem tratamento (PICCIN *et al.*, 2016).

Diversas pesquisas foram realizadas nos últimos anos para o tratamento de efluentes gerados na indústria do couro, envolvendo a área de biotecnologia, por ser uma forma sustentável e econômica de tratar os poluentes. Estes estudos têm usado agentes biológicos, com microalgas, bactérias, fungos e seus bioprodutos para tratamento de efluentes (FONTOURA *et al.*, 2017a; ORTIZ-MONSALVE *et al.*, 2017; SINGH, VYAS & MALAVIYA 2016;).

As microalgas representam uma possibilidade versátil de tratamento de efluentes uma vez que, têm alta capacidade de fixação de dióxido de carbono do ar e fósforo e nitrogênio dissolvidos na água, e se adaptam facilmente às mudanças no ambiente, seja de temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, tornando possível seu cultivo em efluentes (WHITTON, 2012). Estes microrganismos podem ser utilizados ainda para a remoção de metais que estão presentes nos efluentes, uma vez que suas superfícies contêm cargas negativas e adsorvem os íons de metais do efluente líquido (SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2016). Além disso, podem alcançar altas taxas de crescimento celular nestes meios e apresentam soluções mais limpas, quando comparadas a outras alternativas para o tratamento de efluente (ANGELIS *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2017).

Ao final do processo de tratamento do efluente com microalgas, a biomassa gerada pode ser transformada em biocombustível de terceira geração, dando origem ao biodiesel, etanol, bioquerosene, bioplásticos, biohidrogênio, biogás (metano) e intermediários químicos para o setor petroquímico (SINGH & GU, 2010). Ademais, existem diversas outras aplicações para biomassa advinda das microalgas, como por exemplo: biofertilizantes agrícolas, ração animal, compostos alimentares e obtenção de fármacos e pigmentos (ANGELIS *et al.*, 2012).

No entanto, os efluentes brutos da indústria do couro, ou seja, sem nenhum tratamento prévio, são um desafio para o crescimento de microalgas, devido à alta carga química, que muitas vezes pode ser tóxica a estes microrganismos, inibindo o seu crescimento (AJAYAN *et al.* 2015). Fontoura *et al.* (2017a) usaram águas residuais brutas da etapa de ribeira, em diferentes concentrações para cultivar a microalga *Scenedesmus sp.*. Os melhores resultados foram obtidos com 88,4 % de efluente, atingindo concentração máxima de biomassa de 0,90 g L⁻¹, remoção máxima de nitrogênio amoniacal 85,63%, fósforo 96,78% e DQO 80,33%.

Desta forma, as microalgas se tornam uma alternativa atraente para tratamento de águas residuais, uma vez que, esses microrganismos apresentam muitos benefícios, pois além de removerem substâncias indesejadas dos efluentes, possuem alta capacidade de armazenamento de substâncias de reserva em sua biomassa, que pode ser transformada em bioprodutos (JAHAN *et al.*, 2014).

Alguns estudos relataram maior eficiência ao se empregar um consórcio de microalgas na remoção de poluentes e nutrientes, como nitrogênio, fósforo e amônio de águas residuais, quando comparados a microrganismos individuais (KOREIVIENÉ *et al.*, 2014; HENA *et al.*, 2015).

Frente ao que foi discutido, o problema abordado vai de encontro com as diversas vantagens do tratamento de águas residuais com microalgas. Desta forma, o presente estudo foi realizado com o intuito de analisar o crescimento de microalgas e a eficiência de remoção de Nitrogênio Total, Fósforo, Amônia, DBO, DQO, Carbono Orgânico Total, Carbono Total e Carbono Inorgânico do efluente de um curtume de acabamento molhado e acabamento final de couro. Empregou-se um consórcio de microalgas coletado em uma planta de tratamento de efluentes de um curtume, em efluentes de uma indústria de acabamento de couro, variou-se as concentrações do efluente, as composições e os fotoperíodos do cultivo (fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico) e comparou com a microalga abundante no consórcio.

1.1 Objetivos da pesquisa

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho de dissertação de mestrado teve como objetivo avaliar a capacidade de um consórcio de microalgas em crescer e remover poluentes de efluentes de curtume.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de um consórcio de microalgas em efluentes coletados de um curtume que processa couro nas etapas de acabamento molhado ao acabamento final coletados em três estágios na estação de tratamento de efluente: efluente bruto (B), efluente posterior ao tratamento de coagulação/floculação primário (P) e efluente posterior ao tratamento biológico secundário (S).
- Avaliar o crescimento do consórcio de microalgas em diferentes composições de efluente bruto (B) e efluente secundário (S);
- Avaliar o crescimento do consórcio de microalgas em cultivos heterotrófico, fotoautotrófico e mixotrófico em efluente de curtume em diferentes composições;
- Isolar e identificar a espécie predominante no consórcio de microalgas;
- Avaliar o crescimento da microalga isolada no efluente de curtume, nas melhores condições encontradas (nas composições 50% e 75% em cultivo fotoautotrófico), além de verificar a quantidade de lipídios produzido do cultivo;
- Avaliar em cada cultivo as remoções de nitrogênio total, fósforo, amônia, carbono inorgânico, carbono orgânico, carbono total, DBO e DQO.

1.2 Histórico da linha de pesquisa

O Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) desenvolve pesquisas no âmbito de processamento de couros, que englobam a inovação de etapas do processo, gerenciamento dos resíduos gerados e o desenvolvimento de formas mais sustentáveis e econômicas para o tratamento destes resíduos.

Existem várias pesquisas que já foram realizadas no grupo para fim de tratamento dos efluentes da indústria do couro, as quais contribuíram para este trabalho. Cooper *et al.* (2011) e Mella *et al.* (2012) estudaram as etapas fundamentais das operações unitárias do tratamento de efluentes da indústria do couro do Estado do Rio Grande do Sul e Gutterres *et al.* (2015) apresentaram uma visão geral das plantas de tratamentos de efluentes curtumes usados no Estado além de caracterizarem efluentes brutos de curtume.

Pesquisas para o desenvolvimento de tratamentos biológicos do efluente de couro também foram desenvolvidos no LACOURO. Agustini *et al.* (2016) avaliou a biodegradação de resíduos sólidos da indústria do couro para a produção de biogás com alto teor de metano a partir de microrganismos isolados de lodos de aterros, enquanto Ortiz-Monsalve *et al.* (2017) estudaram a descoloração e degradação corantes dos efluentes de tingimento do couro através

do fungo *Trametes villosa* SC10. Recentemente Fontoura *et al.* (2017a) realizaram estudos sobre a influência da intensidade da luz e da concentração de águas residuais da etapa de ribeira na produção de biomassa e remoção de nutrientes por microalgas *Scenedesmus sp.*, que contribuíram de forma expressiva para a fundamentação prática e teórica deste trabalho.

1.3 Estrutura do trabalho

Este trabalho é composto por 5 capítulos, os quais são apresentados em síntese a seguir:

Capítulo I – Introdução: neste capítulo é feita uma introdução sobre o assunto da pesquisa realizada. São apresentados a problemática dos efluentes da indústria do couro e o potencial das microalgas para remoção de nutrientes, seguidos dos objetivos e a estrutura do trabalho.

Capítulo II – Revisão bibliográfica: são descritas neste capítulo, as etapas do processamento do couro e efluentes gerados. Além de uma revisão sobre os conceitos importantes para o entendimento das formas de cultivo de microalgas, bem como os fatores que influenciam seu crescimento e as técnicas de isolamento de uma cultura unialgal.

Capítulo III – Materiais e Métodos: neste capítulo é detalhada a parte experimental, os materiais usados para realizar o tratamento do efluente de curtume com consórcio de microalgas e os locais onde foram coletados e as formas de cultivos utilizadas.

Capítulo IV – Resultados e Discussão: neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir das análises realizadas e relacionados com resultados já encontrados por outros autores.

Capítulo V – Conclusão: neste capítulo são apresentadas as conclusões obtidas a partir deste estudo e sugestões para continuidade deste trabalho.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão teórica sobre microalgas, abordando aspectos relativos à classificação, fatores que influenciam o crescimento, diferentes formas de cultivo e isolamento. Na sequência, são apresentados o cenário da indústria coureira no Brasil, as etapas de processamento e os efluentes gerados, dando ênfase na utilização das microalgas para o tratamento das águas residuárias geradas em curtumes.

2.1. Microalgas

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes, em sua maioria unicelulares microscópicos, podendo ser procarióticos ou eucarióticos, que se diferem quanto à origem, composição química e morfologia. Aproveitam a energia solar consumindo o dióxido de carbono na fotossíntese, transformando-o em compostos orgânicos que, posteriormente podem serem transformados em gorduras dentro da célula (CAMPOS; BARBARINO; LOURENÇO, 2010). Além do dióxido de carbono, são essenciais para o metabolismo das microalgas o nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e alguns outros nutrientes (RAMIREZ *et al.*, 2014)

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Em microalga verde, por exemplo, o complexo sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenoide captura energia solar na forma de fótons. Esta energia é utilizada pelo fotossistema II na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e molécula de O₂. Os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do

tilacóide, o qual é utilizado para conduzir a produção de ATP via ATP sintase. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO₂ é fixado em moléculas de três átomos de carbono que são assimilados em açúcares, amido, lipídios, ou outras moléculas exigidas para o crescimento celular. Já o substrato para a hidrogenase, H⁺ e e⁻, são supridos tanto via cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos como via fermentação do carboidrato (amido) armazenado (CARDOSO *et al.*, 2011).

Desta forma, na composição da biomassa das microalgas são encontrados lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, que variam de acordo com cada espécie e as condições de cultivo (ARCEO, 2012). Estes compostos podem ser extraídos e podem ter grande valor agregado.

O cultivo de microalgas quando comparado ao de plantas terrestres apresenta rendimentos maiores de produção de biomassa, uma vez que oferece maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores além de apresentarem a mesma composição química em toda a biomassa, ademais as microalgas não competem com a atividade agrícola, pois não utilizam terras aráveis para o cultivo (BROWN & ZEILER, 1993; RAVEN *et al.* 2001). Entretanto, a demanda de água é tão alta quanto para as plantas, requerendo entre 11 a 13 milhões L ha⁻¹ ano⁻¹ para o cultivo em lagoas abertas (CHINNASAMY *et al.*, 2010).

Porém, recentemente existe um grande investimento em pesquisas de cultivos de biomassa de microalgas para a produção de biocombustíveis. Esta atividade é justificada pelo potencial que estes microrganismos ofertam na produção de maiores quantidades de lipídios por área de solo em relação às plantas oleaginosas (WIJFFELS & BARBOSA, 2010). Os lipídios encontrados nas microalgas possuem propriedades físico-químicas e químicas análogas aos de óleos vegetais, sendo uma matéria-prima potencial para a produção de biodiesel.

Outra justificativa para produção de biocombustíveis através do uso da biomassa de microalgas, é possibilidade de serem cultivadas em efluentes domésticos (CHAN *et al.*, 2013), agrícolas (HU *et al.*, 2013), e industriais (CHINNASAMY *et al.*, 2010), superando o obstáculo do uso de grandes quantidades de água para o cultivo.

2.1.1 Classificação

Duarte (2010) explica que microalgas compreendem o grupo de microrganismos com clorofila a e outros pigmentos fotossintéticos, mas não possuem valor taxonômico. Estima-se que cerca de 30.000 a 40.000 espécies de microalgas foram identificadas e classificadas em grupos (MATA *et al.*, 2010; DEMIRBAS *et al.*, 2011; BOROWITZKA & MOHEIMANI, 2013) e o tamanho das microalgas, dependendo da espécie, pode variar de 1 a 100 µm (AJAV *et al.*, 1999; HE *et al.*, 2003).

Para classificar as microalgas são necessários critérios como a natureza química dos produtos de reserva, os tipos de pigmentos e os constituintes da parede celular. Outros aspectos que têm sido considerados são a citologia e morfologia, como por exemplo a ocorrência de flagelos, a estrutura dos flagelos, a divisão celular e os processos de formação do núcleo, a presença e a caracterização de envoltório dos cloroplastos e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além disso, existem as técnicas de biologia molecular que têm sido muito usadas, por sua precisão nos resultados (TOMASELLI, 2004).

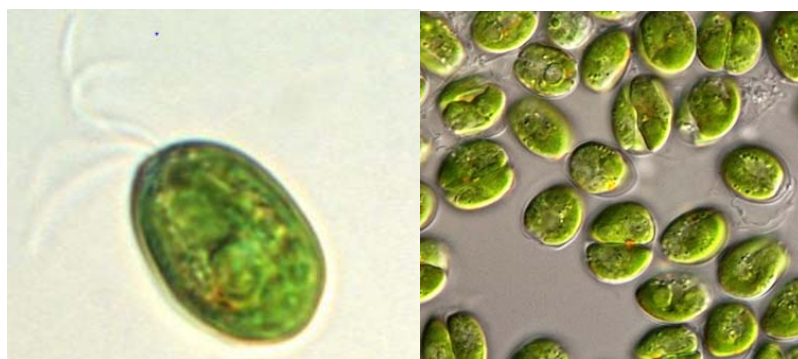
A Tabela 1 mostra as classificações de acordo com filo, classe, ordem, família e gênero da microalga *Tetraselmis*. Dentro da divisão chlorophyta existe uma pequena classe chamada Chlorodendrophyceae, compreendendo os gêneros *Tetraselmis* e *Scherffelia*, (MASSJUK & LILITSKA, 2006; LELIAERT *et al.*, 2012). A forma e o tamanho das células Chlorodendrales variam de acordo com a espécie.

Tabela 1. Visão geral da classificação da microalga *Tetraselmis*

Reino	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero
Plantae	Chlorophyta	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	<i>Tetraselmis</i>

O gênero *Tetraselmis* inclui cerca de 26 espécies aceitas (NORRIS *et al.*, 1980; SYM & PIENAAR, 1993) e embora muitas de suas espécies sejam bem caracterizadas quanto a sua morfologia e estrutura, a atribuição correta das espécies é árdua, por causa de metodologias complexas para caracterização celular, como por exemplo, a necessidade de observações por microscopias eletrônica (LEE & HUR, 2009). A Figura 1 ilustra as microalgas *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis suecica*.

Figura 1. *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis suecica* (Bunthawin *et al.*, 2011; Baker, 2012)



As microalgas marinhas *Tetraselmis* são flageladas e unicelulares com aproximadamente 15 a 23% de lipídios na composição celular quando cultivadas em sistema fototrófico (CHISTI, 2007). RODOLFI *et al.* (2009) estudaram algumas espécies de

Tetraselmis em cultivo fototrófico e obtiveram 14,7% de lipídios para *Tetraselmis sp.*, 8,5% para *Tetraselmis suecica* F&M-M33, 12,9% para *Tetraselmis suecica* F&M-M35 e 20,6% para *Tetraselmis pseudonana* CS173.

As espécies de *Tetraselmis* são economicamente importantes, pois são ideais para o cultivo em massa. O gênero é amplamente utilizado em instalações de aquicultura como alimento para moluscos e larvas de camarão, pois possuem maiores valores de proteínas e carboidratos quando comparadas a outras microalgas (AZMA *et al.*, 2011).

2.1.2 Lipídios, proteínas, carboidratos e aplicações

Cada microalga tem um metabolismo diferente variando suas concentrações de lipídios, proteínas e carboidratos na composição celular. Estas concentrações também podem variar de acordo com o meio de cultivo, ou seja, as quantidades de nutrientes presentes no meio interferem nas rotas metabólicas das microalgas, fazendo que elas armazenem quantidades diferentes destes componentes.

A composição da célula da microalga pode chegar a valores até 80% do peso seco da biomassa (SPOLAORE *et al.*, 2006), entretanto, comumente são encontrados valores entre 20-50% de lipídios na composição da célula. Estudos mostram que menores quantidades de nitrogênio presentes no meio geram maior acúmulo de lipídios na célula (RICHMOND, 2004).

As maiores concentrações de carboidratos também são atingidas quando ocorre o estresse nutricional, pois a microalgas param de se dividir e começam a sintetizar carboidrato e lipídios para armazenar energia (CHAGAS *et al.*, 2010). Os carboidratos presentes na biomassa podem ser convertidos em etanol via fermentação.

Algumas espécies de microalgas, no entanto, apresentam elevadas concentrações de proteínas, podendo chegar a 63% da biomassa (BECKER, 2007). Quando altas concentrações de proteínas são encontradas na biomassa, esta pode ser utilizada como suplemento alimentar.

Níveis altos de lipídios na biomassa são ideais para a produção de biodiesel e uma biomassa rica em proteínas e carboidratos é de extremo interesse para produção de rações e adubo. Quando destinadas a estes fins a produção de biomassa pode ocorrer simultaneamente aos processos de tratamento de efluente (MICHELON *et al.*, 2015).

2.1.3 Fatores que influenciam no crescimento

Existem alguns fatores que devem ser controlados, pois podem influenciar o cultivo de microalgas, aumentando ou diminuindo a taxa de crescimento. São eles: a temperatura, o

pH, a salinidade, a concentração dos nutrientes, a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a agitação do meio, a concentração do inóculo, a natureza do meio de cultura e a contaminação (LOURENÇO, 2006). No entanto, o comportamento diverso das diferentes espécies dificulta o apontamento de valores ótimos de cada uma destas variáveis.

2.1.3.1 Luminosidade

Behrens (2005) aponta que a luz é uma das principais variáveis a ser controlada na otimização do processo de crescimento, seguida da temperatura, do pH e da presença de CO₂ e O₂ no meio.

No entanto, a elevada exposição a fótons pode causar a fotoinibição, resultando na diminuição da capacidade de realizar a fotossíntese da microalga e por consequência ocorre o branqueamento e a morte celular (SOLETTO *et al.*, 2005; MEHLITZ, 2009; MULLER, LI, & NIYOGI, 2001).

Existem microalgas que tem a capacidade de fixar o nitrogênio molecular através de células específicas e utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono, o que faz com que consigam sobreviver na ausência de luminosidade (BRACHER, 2015).

Fontoura *et al.* (2017a) ao variar a concentração de efluente de ribeira de um curtume (entre 20% e 100%) e a intensidade de luz (80 a 200 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) observou que a produtividade máxima da biomassa de *Scenedesmus sp.* (210,52 $\text{mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) ocorreu no ensaio com maior intensidade da luz 200 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 60% de efluente de curtume. Sobretudo uma concentração máxima de biomassa (0,90 g L^{-1}) e uma taxa de crescimento máximo específico (0,081 d^{-1}) foi alcançada para a concentração de 88,4% de águas residuais de curtumes e intensidade da luz de 182,5 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.1.3.2 Temperatura

Temperaturas acima de 30°C são consideradas altas para a maioria das espécies, desta forma, é aconselhável trabalhar com temperaturas inferiores (SUALI & SARBATLY, 2012). As temperaturas ideais para o cultivo de microalgas são de 20 a 30°C (ISLAM, HEIMANN & BROWN, 2017). Lourenço (2006) indica o uso de temperaturas ambientes para realização dos trabalhos, uma vez que há a redução de custos no processo.

Estudos com a microalga *Tetraselmis* tem uma ampla variação de temperatura, a Tabela 2 mostra algumas temperaturas utilizadas na literatura.

Tabela 2. Temperaturas usadas no cultivo de *Tetraselmis*

Microalga	Temperatura	Referência
Consórcio de 15 microalgas: (<i>Tetraselmis suecica</i> , <i>Tetraselmis chuii</i> entre outras)	25 ±1°C	CHINNASAMY <i>et al.</i> , 2010
<i>Tetraselmis suecica</i>	30 °C	AZMA <i>et al.</i> 2011
<i>Tetraselmis chuii</i> e <i>Tetraselmis suecica</i>	24 ± 1°C	PALUDO, 2012
Estirpes de <i>Tetraselmis</i>	15 ±2°C	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2015
<i>Tetraselmis sp.</i>	20 °C	SCHULZE <i>et al.</i> , 2017

2.1.3.3 pH

O cultivo de microalga pode ser realizado com pH entre 5,0 a 9,0. A atividade biológica das células, na qual as microalgas consomem o carbono inorgânico dissolvido, faz que seja notada uma elevação gradual do pH. Desta forma, durante o cultivo podem ser alcançados pH elevados, como 9,0 e 9,5, que podem ser tóxicos a muitas espécies.

Esta variável influencia na solubilidade dos minerais e CO₂, interferindo na disponibilidade destes no meio, e por consequência no crescimento das microalgas. Dependendo do pH que o meio aquoso se encontra, as proporções do carbono inorgânico podem variar para as suas formas CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ bicarbonato e CO₃⁻ carbonato (ESTEVES, 1998).

2.1.3.4 Agitação

Outra variável importante é a agitação do meio, uma vez que proporciona uma exposição homogênea das microalgas à luz, e evita a sedimentação da biomassa. Além de distribuir os nutrientes de forma uniforme deixando-os suspensos no meio, impedindo que se cristalizem (MONTEIRO, LUCHESE & ABSHER, 2010).

Como o CO₂ é um gás solúvel em água e é uma das fontes de carbono usada pelas microalgas, é comum realizar a agitação do meio com inserção de CO₂ ou até mesmo com ar atmosférico através de compressores (LOURENÇO, 2006).

2.1.3.5 Tipos de cultivo

O crescimento e a composição das microalgas variam conforme as condições de cultivo. A Tabela 3 expõe as características das principais formas de cultivo.

Tabela 3. Características das condições dos cultivos Fotoautotrófico, Heterotrófico e Mixotrófico

Cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono	Aplicação	Características
Fotoautotrófico	Luz	Inorgânico	Lagoa aberta ou Fotobiorreator	Densidade celular baixa Custo de condensação elevado
Heterotrófico	Orgânico	Orgânico	Fermentador convencional	Contaminação Alto custo do substrato
Mixotrófico	Luz e orgânica	Inorgânico e orgânico	Fotobiorreator fechado	Contaminação Alto custo do equipamento e substrato

O cultivo mais empregado é o fotoautotrófico no qual a luz é utilizada como fonte de energia e se converte em energia química, crescendo a partir da utilização de CO₂ (GOUVEIA & OLIVEIRA, 2009; ILLMAN *et al.*, 2000; MANDAL & MALLICK, 2009; YOO *et al.*, 2010), e utilizando as técnicas de lagoas aeradas abertas ou fotobiorreatores fechados (CHEN *et al.* 2011, CHEN *et al.* 2011).

O cultivo heterotrófico representa a utilização de composto orgânico tanto como fonte de energia, quanto como fonte de carbono para a formação de biomassa (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Neste cultivo, os compostos orgânicos como o acetato, a sacarose, a glicose, a lactose, a frutose, o glicerol e a galactose substituem o CO₂ (MAROUBO, 2013).

De acordo com Azma *et al.* (2011), a melhoria substancial da concentração celular final (28,88 g L⁻¹) e do teor de lipídios (53,8%) no cultivo heterotrófico da microalga *Tetraselmis suecica* atingida em condições ótimas dos compostos orgânicos (5,78 g L⁻¹ de glicose, 9 g L⁻¹ peptona, 4,48 g L⁻¹ extrato de levedura e 3,01 g L⁻¹, extrato de carne), é uma maneira promissora para a produção de lipídio e subsequente de biodiesel.

No entanto, existem algumas barreiras a serem superadas, pois em sistemas abertos pode ocorrer facilmente a contaminação do cultivo heterotrófico, tornando-se um problema para a produção em larga escala e além disso, do ponto de vista econômico, os custos com carbono orgânico são maiores, quando comparado às outras alternativas (CHEN *et al.*, 2011).

Já o cultivo mixotrófico acontece quando as microalgas utilizam o composto orgânico ou o carbono inorgânico para o seu crescimento permitindo que elas vivam tanto em condições heterotróficas quanto fotoautotrófica (MAROUBO, 2013). Neste cultivo, as

microalgas assimilam compostos orgânicos e CO₂ como fonte de carbono, e o CO₂ liberado através da respiração é reutilizado no cultivo fototrófico (MATA *et al.*, 2010).

2.1.4 Isolamento

Uma etapa elementar dos estudos com microalgas é o isolamento das linhagens de interesse. Existem várias técnicas para obtenção de uma única espécie, descrita por diversos autores (GONZALEZ *et al.*, 1995; ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006), no entanto, trata-se de uma tarefa trabalhosa e lenta.

O processo de isolamento por pipetagem e diluições sucessivas é empregado para microalgas com tamanho superior a 10 µm. O mesmo consiste na localização da microalga de interesse por um microscópio estereoscópico, seguida de coleta com pipeta Pasteur e transferência para meios de cultura adequados. Este método deve ser realizado sucessivamente até a obtenção de uma única célula. O método de isolamento em meio sólido é aplicado para microalgas pequenas de nanoplâncton e picoplâncton, no qual, são feitas estrias com uma alça bacteriológica em placas de Petri com meio Ágar utilizando uma amostra do meio contendo microalgas. Uma outra alternativa muito utilizada é o isolamento por diluição em série, onde são realizadas diluições sucessivas da amostra em meio de cultivo. Este método é mais utilizado quando a espécie desejada é abundante no meio (LOURENÇO, 2006).

Estes métodos apresentam eficiências variáveis e para a comprovação destas técnicas é necessária a avaliação para identificar se houve êxito no processo. Em geral, existem três maneiras de comprovar que não há contaminantes no meio ou a presença de outra espécie indesejada. A principal maneira e mais simples é por microscopia óptica ou eletrônica, que consiste em avaliar a presença de contaminantes como bactérias e outras espécies de microalgas. Na microscopia ótica convencional é sugerido o uso dos recursos como campo claro e campo escuro e contraste de fases para uma melhor observação da imagem gerada (LOURENÇO, 2006; LUBIANA, 2013).

As outras duas maneiras de identificar a presença de contaminantes é contagem de células por citometria de fluxo e testes de crescimento de fungo e bactérias.

2.2 Indústria do Couro

O crescente interesse no mercado de couros nas últimas décadas fez com que esta atividade se tornasse muito importante na economia do Brasil, tornando o país um dos maiores produtores de couro do mundo. A maior contribuição neste setor é propiciada pelo Estado do

Rio Grande do Sul, por ter grandes quantidades de rebanhos bovinos, sendo este estado o maior produtor de couro do país (ABQTIC, 2017).

2.2.1 Processamento do couro

O processamento do couro consiste em transformar a pele salgada ou verde em couro acabado através de operações clássicas. As operações de processamento do couro são divididas agrupadas em três etapas principais: ribeira, curtimento e acabamento.

Nas operações de ribeira é realizada a limpeza da pele. Nesta etapa, a pele é hidratada, depilada, são retiradas as partes que não constituirão o couro e a estrutura proteica é preparada para receber outros produtos nas próximas etapas (GUTTERRES, 2014).

No curtimento a pele é transformada em couro propriamente dito. Conforme a substância que é utilizada, o curtimento pode ser mineral ou vegetal. O mais utilizado no Brasil e no mundo é o curtimento com sais de cromo. Este curtente dá origem ao couro wet-blue, assim chamado pela aparência úmida e azulada. Após esta etapa, o material deverá ficar estável e imputrescível, ou seja, resistente as ações químicas, físicas e biológicas (GUTTERRES, 2014).

Por fim, a fase de acabamento pode ser dividida em: acabamento molhado e acabamento final, na qual é gerado o produto couro acabado de maior valor agregado do processo produtivo. Estas etapas proporcionam propriedades como a cor, maciez, elasticidade, dentre outras, atribuindo o aspecto final do material (GUTTERRES, 2014).

2.2.2 Acabamento molhado e acabamento final

O acabamento molhado é subdividido em etapas que são realizadas posteriormente ao curtimento do couro dando enchimento, firmeza de flor, tamanho de poro, lixabilidade, cor, maciez e pode ser dividida em: desacidulação, recurtimento, tingimento e engraxe.

Desacidulação

Na desacidulação ocorre a neutralização dos ácidos presentes no couro através do ajuste do pH, esse processo é realizado para tornar as cargas do couro compatíveis, facilitando posteriormente a absorção pelo couro de recurtentes, corantes e agentes de engraxe. Entre os desacidulantes mais utilizados estão o carbonato de sódio, o bicarbonato de sódio e o formiato de sódio (GUTTERRES, 2014).

Recurtimento

No recurtimento é conferido enchimento, aparência uniforme e toque ao couro pela penetração por gradiente de concentração e ação mecânica de recurtentes, os quais irão fechar os poros e preparar a estrutura para as operações de tingimento e engraxe. São definidas nesta etapa, as características do material, como por exemplo, maciez, elasticidade, resistência físico-mecânica, enchimento e algumas características da flor, como toque e desenho do poro. São comumente utilizados na etapa de recurtimento os sais minerais (sais de cromo, alumínio e zircônio), taninos vegetais e sintéticos, resinas e gutaraldeído (AQUIM, 2006).

Tingimento

No tingimento é atribuída coloração e tonalidade de interesse ao couro. Esta etapa é realizada em meio líquido e são utilizadas grandes concentrações de corantes orgânicos e sintéticos para garantir que o processo seja eficiente, sendo capaz de tingir a superfície externa e interna do couro (HEIDEMANN, 1993). Os corantes ácidos são os mais utilizados, possuem grupos cromóforos azo, uma vez que conferem maior estabilidade à cor e uniformidade ao produto final (ORTIZ-MONSALVE, 2015).

Engraxe

Na etapa de engraxe é conferida maciez e impermeabilidade, pois as fibras e fibrilas são lubrificadas com óleos, garantindo um coeficiente de fricção apropriado entre elas de modo a evitar que se unam durante a etapa de secagem (MANCOPES, 2011).

Na etapa final da produção do couro, ou seja, o acabamento final, é realizado o revestimento da superfície com produtos químicos para dar características desejadas, buscando sempre atender os requisitos da moda através de efeitos envelhecidos, texturas, relevos, abrilhantados e filmes, além de atribuir durabilidade ao produto (WINTER, 2014).

Desta forma, as características gerais dos efluentes líquidos gerados no processamento das peles são atribuídas à elevada carga orgânica e nitrogenada das etapas iniciais de processo associadas às operações de limpeza das peles e pH alcalino. Durante o curtimento, os efluentes caracterizam-se pela presença de metais, como o cromo e outros agentes curtentes, ou ainda compostos orgânicos (taninos) e pH ácido (BERTOLDI *et al.* 2016; GUTTERRES *et al.*, 2014). Os efluentes gerados nas etapas de acabamento molhado e final possuem grandes quantidades de substâncias químicas solúveis ou em emulsão, como os corantes, tensoativos, recurtentes sintéticos e óleos, cromo residual das lavagens que impedem a reutilização e dificultam o tratamento da água (PICCIN *et al.* 2016; GUTTERRES *et al.*, 2014). Estas águas residuais apresentam alta carga de toxicidade e baixa biodegradabilidade, e

devem ser tratadas antes de ser descarregada para as fontes de água (DI LACONI *et al.*, 2001). A Tabela 4 mostra cada etapa sua finalidade durante o processo e os reagentes utilizados no processo.

Tabela 4. Produtos químicos empregados por etapa de processamento do couro.

Etapa	Sub-etapas	Finalidade	Produtos Utilizados
Ribeira	Conservação	Evitar a decomposição das peles	Sal (cloreto de sódio), agentes conservantes microbicidas
	Remolho	Repor o teor de água às peles	Sais, álcalis, ácidos, tensoativos, enzimas, bactericidas
	Depilação e caleiro	Remover epiderme juntamente com pelos, lâ e outros materiais queratinosos da pele	Cal e sulfeto de sódio, aminas, enzimas
	Desencalagem	Eliminar a cal adicionada na etapa de caleiro e ajustar o pH para a purga	Sais amoniacaais, bissulfíto de sódio ou ácidos fracos
	Purga	Etapa enzimática de limpeza da pele e remoção final da epiderme	Enzimas proteolíticas (pancreáticas, microbianas)
	Píquel	Desidratar, acidificar a pele e interromper a atividade enzimática	Ácidos, especialmente, sulfúrico e fórmico
Curtimento	Curtimento	Atribuir à pele estabilidade química, térmica e mecânica, transformando-a em couro	Sais de cromo, taninos vegetais, biocidas
Acabamento	Desacidulação	Neutralizar parte da acidez presente no couro	Bicarbonato de sódio, formiato de sódio, taninos neutralizantes
	Recurtimento	Conferir propriedades químicas e físico-mecânicas ao couro	Sais de Cr, Al, Zr, taninos vegetais e sintéticos, aldeídos, resinas
	Tingimento	Conferir cor	Corantes e alguns auxiliares, ácidos
	Engraxe	Lubrificar as fibras, conferir maciez ao couro, impermeabilizar	Óleos, agentes tensoativos
	Acabamento	Conferir propriedades de superfície e aspecto do produto final	Polímeros, solventes, pigmentos

2.3 Legislação Ambiental aplicada aos efluentes líquidos

O órgão que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes líquidos no Brasil é o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Em 2005, foi publicada a Resolução CONAMA nº 357/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e cita as condições e padrões de lançamento dos efluentes. Em 2011, foi publicada a resolução nº 430, de 13 de maio de 2011, criada para complementar e alterar parcialmente a anterior, nº 357, de 17 de março de 2005. No Estado do Rio Grande do Sul o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA) lançou a Resolução nº 355/2017 que define os novos padrões de emissão de efluentes em corpos da água.

A descarga de águas residuais carregadas com nutrientes (nitrogênio e fósforo) em águas superficiais leva à eutrofização e traz uma séria de ameaça ao meio aquático. Portanto, o

tratamento para remoção de nutrientes tem se tornado obrigatório em todo o mundo. Os limites de descarga de nutrientes exigidos pelo CONSEMA 355/2017 são de 20 mg L⁻¹ para o nitrogênio amoniacal e 1 - 4 mg L⁻¹ para o fósforo total, e ainda são superiores aos limiares (nitrogênio total menor que 1,2 mg L⁻¹; fósforo total menor que 0,1 mg L⁻¹) que causam eutrofização das águas (CHAMBERS *et al.*, 2012).

Com a preocupação em se adequar às regulamentações governamentais de descargas de efluentes que estão cada vez mais rigorosas, as indústrias buscam estratégias para otimizar os procedimentos de tratamento de efluentes, visando o desenvolvimento de processos eficientes, sustentáveis e de custos reduzidos.

O cultivo de microalgas tem se mostrado um benefício no tratamento de águas residuais, por ser uma alternativa de baixo custo, além da composição química da microalga poder ser manipulada de acordo com as necessidades, através da variação de algumas condições de cultivo como luminosidade, temperatura, salinidade, restrição de nutrientes e o tempo da cultura para a obtenção da biomassa que possa ser aproveitada ao final do tratamento (PANDEY *et al.*, 2014).

2.4 Tratamento de efluentes de curtume

Os tratamentos usualmente utilizados na indústria do couro podem ser divididos basicamente em primários, secundários e terciários (GUTTERRES *et al.*, 2015). No tratamento primário é realizada coagulação/floculação do efluente de curtumes. Geralmente, são usados coagulantes inorgânicos como o sulfato alumínio, cloreto férrico, sulfato ferroso, afim de reduzir DQO, sólidos suspensos e remover substâncias tóxicas para que o efluente passe para o tratamento secundário (LOFRANO *et al.*, 2013)

No tratamento secundário, os processos biológicos reduzem o conteúdo orgânico e alguns nutrientes como o nitrogênio e o fósforo, porém efluentes com alta concentração de taninos e outros compostos pouco biodegradáveis, como os metais, podem inibir o processo (BENVENUTI, 2015). Lofrano *et al.* (2013) descrevem as formas de tratamento biológico: processos anaeróbios e processos aeróbios. Os processos aeróbicos com lodo ativado, são mais utilizados nos curtumes, neste processo existe a formação de grandes quantidades de lodo, no qual parte é recirculado ao sistema e o restante recebe uma destinação final (DURAI & RAJASIMMAN, 2011).

Em alguns curtumes são empregados também os tratamentos terciários, os quais são realizados como intuito de alcançar aprimoramento do efluente, porém após ao tratamento secundário, muitas vezes o efluente já está adequado para ser lançado de volta aos corpos

hídricos. Os tratamentos que vem sendo utilizados são: biológico, como biorreatores de membranas, ou químicos e físicos, como osmose reversa, ultrafiltração, processos baseados em Fenton, processos oxidativos avançados, processos de foto-oxidação, ozonização, adsorção e fotocatalise (GUTTERRES & AQUIM, 2013; LOFRANO *et al.*, 2013; PICCIN *et al.*, 2016).

No âmbito de tratamento de efluentes amigáveis ao meio ambiente estão os tratamentos biológicos de efluentes. Existem diversos estudos sobre essas técnicas aplicadas em águas residuais de curtimento na literatura, algumas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Formas de tratamento biológico de águas residuais da indústria do couro

Tipo de efluente	Tipos de tratamentos	Microrganismos	Referências
Ribeira / Bruto	Remoção de nutrientes e diminuição de DQO	Microalgas	FONTOURA <i>et al.</i> , 2017a
Planta de tratamento de curtume/ Bruto	Remoção de cromo	Bactérias	BHARAGAVA & MISHRA, 2018.
Acabamento molhado / Bruto	Biossorção de corantes	Microalgas	FONTOURA <i>et al.</i> , 2017b
Acabamento molhado / Bruto	Remoção de corantes	Fungos	ORTIZ-MONSALVES <i>et al.</i> , 2017
Efluente de curtume / Bruto	Remoção de metais tóxicos	Microalgas	AJAYAN <i>et al.</i> , 2015
Planta de tratamento 150 curtumes / após Eletrocoagulação	Remoção de DQO e cor	Biorreator de membrana	KEERTHI <i>et al.</i> , 2013

2.5 Tratamento de efluentes com microalgas

As microalgas têm mostrado grande potencial para o tratamento dos mais diversos poluentes, uma vez que são microrganismos que apresentam remoção eficiente de matéria orgânica, nitrogênio, fósforo, entre outros nutrientes presentes no meio, e fixação de CO₂ (MORENO-GARRIDO, 2008). As microalgas também podem utilizar os nutrientes presentes em efluente para a produção de biomassa e, portanto, diminuir os problemas de eutrofização (YEN *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que as microalgas removem principalmente os nutrientes, nitrogênio e fósforo, que são as principais causas de eutrofização de corpos hídricos onde são despejados efluentes sem tratamento. Wang *et al.* (2011) observaram que *Neochloris oleoabundans* removeu completamente o nitrogênio e fósforo presentes em amostras de efluentes secundários de águas residuais municipais com concentrações de 218 mg N-NO₃ L⁻¹ e 47 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ a taxas de 43,7 mg N L⁻¹ dia⁻¹ e 9,4 mg P L⁻¹ dia⁻¹.

2.6 Tratamento de efluentes com consórcios de microalgas

Alguns estudos relataram maior eficiência ao se empregar um consórcio de microalgas na remoção de poluentes e nutrientes, como nitrogênio, fósforo e amônio de águas residuais, quando comparados a microrganismos individuais (KOREIVIENÉ *et al.*, 2014; HENA *et al.*, 2015).

Koreiviené *et al.* (2014) relataram que o consórcio de microalgas contendo *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, se mostrou mais eficiente na remoção de nitrogênio e fósforo de águas residuais municipais, quando comparado a cultura individual de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.*, obtendo após três semanas de cultivo do consórcio remoções de 88,6 a 96,4% e 99,7 a 99,9%, de nitrogênio e fósforo, respectivamente.

Hena *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de produção de biodiesel a partir do consórcio de cultura de microalgas em águas residuais de uma fazenda leiteira e compararam com *C. saccharophila* e *Scenedesmus sp.*. O consórcio de microalgas foi isolado do tanque de águas residuais não tratada gerada na fazenda leiteira, bem como do tanque de águas residuais após ter passado pelo tratamento secundário. O consórcio de microalgas apresentou maior produção de biomassa (219,87 t ha⁻¹ ano⁻¹) e teor de lipídios (23,62%) em águas residuais tratadas e 72,70% dos lipídios obtidos do consórcio foram convertidos em biodiesel.

2.7 Tratamento de efluentes de curtume com microalgas

Alguns estudos vêm sendo consolidados para se realizar o tratamento de efluentes da indústria de curtume com a utilização das microalgas. Um estudo foi proposto por Meriç *et al.* (2005), com o intuito de investigar a toxicidade do efluente de curtimento de couro aplicando a microalga *D. tertiolecta* em três etapas do tratamento: efluente bruto, após a coagulação/floculação e após o tratamento biológico. Neste estudo foi relatada a inibição do crescimento de microalgas, quando colocadas em efluente bruto ou coagulados/floculados, porém quando o efluente passou pelo tratamento biológico resultou em uma toxicidade menor, no qual a microalga conseguiu um melhor crescimento. Resultados de remoção da demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos solúveis totais (SST) no processo de coagulação/floculação foram de 62% e 84%, respectivamente, enquanto, as remoções de DQO, SST e NH₄-N, no efluente final da estação de tratamento, foram de 92%, 90% e 50 %, respectivamente.

Ajayan *et al.* (2015) estudaram a fitorremediação de efluentes de curtume sem tratamento prévio, em diferentes concentrações, usando *Scenedesmus sp.* isolada do habitat

natural. Os autores verificaram que o melhor crescimento de espécie foi no efluente com uma diluição de 50% e que em 12 dias de cultivo houve remoção de N-NO₃ e P-PO₄, de 44,3% e 95%, respectivamente. Também houve remoção dos metais tóxicos Cr (81,2 a 96%), Cu (73,2 a 98%), Pb (75 a 98%) e Zn (65 a 98%) variando com a diluição do efluente, e os resultados se mostraram mais eficiente na concentração de 10% de efluente.

O estudo feito por Sundaramoorthy *et al.* (2016) com quatro espécies de microalgas isoladas de um efluente de curtume (*Anabaena* VITMA1, *Oscillatoria acuminata* VITMA2, *Phormidium irriguum* VITMA3 e *Spirogyra maxima* VITMA4), examinou a interação da biomassa de microalgas com metais tóxicos. Os resultados indicaram que os isolados tiveram a capacidade de tolerar o stress devido à presença de cromo e, por conseguinte, podem ser cultivados em efluentes de tratamento de curtume, além da alta capacidade de bioadsorção, chegando a 90% de remoção do Cromo pela *Oscillatoria acuminata*.

Recentemente, Fontoura *et al.* (2017a) cultivaram microalgas *Scenedesmus sp.* no efluente de curtume da etapa de ribeira, sem tratamento prévio e sem adição de nutrientes em uma diluição 1:1 em água. Culturas foram realizadas em reatores de 5 litros por 18 dias. Houve grande remoção de NTK (95,5%), nitrogênio amoniacal (97,9%), fósforo (97,36%), DQO (92,91%) e DBO (91,35%). Também neste mesmo estudo, verificou-se a possibilidade da microalga *Scenedesmus sp.* assimilar o composto recalcitrante nonilfenol etoxilado usado como surfactante na indústria do couro. Foi observada remoção de 67,85% nonilfenol etoxilado, após 28 dias de teste, para uma concentração de composto inicial de 1,0 mg L⁻¹.

O efluente gerado na etapa de acabamento apresenta alguns fatores que podem interferir no cultivo de microalgas, uma vez que este apresenta menores quantidades de nutrientes essenciais para o crescimento destes microrganismos, como por exemplo, nitrogênio e fósforo e há presença de inibidores e compostos tóxicos recalcitrantes (MUNZ *et al.*, 2008) e efluente de baixa biodegradabilidade (GANESH, BALAJI & RAMANUJAM, 2006).

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo é descrita a metodologia empregada no trabalho, considerando desde a coleta do consórcio de microalgas, isolamento da microalga predominante e a posterior identificação visual até os ensaios de cultivos realizados em efluente de curtume. Os ensaios com cultivo do consórcio de microalgas em efluentes reais da indústria do couro estão descritos em quatro etapas: a primeira teve como objetivo selecionar o melhor efluente de diferentes etapas do tratamento para crescimento do consórcio de microalgas e remoção de poluentes. Na segunda etapa considerou-se o efluente bruto para realizar ensaios com diferentes composições do efluente e analisar o crescimento do consórcio. Na terceira etapa considerou-se a realização de cultivos mixotrófico, heterotrófico e fotoautotrófico com o consórcio de microalgas em efluente com diferentes composições. Na quarta etapa considerou-se apenas o cultivo fotoautotrófico com a microalga isolada em efluente com diferentes composições. Análises foram realizadas para avaliar os cultivos através do crescimento de biomassa ao longo dos dias e análises dos efluentes quanto a remoção dos nutrientes NT, P-PO₄, CI, COT, dos parâmetros DBO, DQO e porcentagem de lipídios presentes. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Couro e Meio Ambiente (LACOURO) e no Laboratório do Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP) no campus Centro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

3.1 Consórcio de microalgas

3.1.1. Coleta e manutenção do Consórcio

O consórcio de microalgas foi coletado em um decantador desativado de uma planta de tratamento do Curtume Nimo, localizado na cidade de Montenegro, Rio Grande do Sul, Brasil. O curtume realiza todas as etapas de processamento do couro (ribeira até couro acabado) para obter o produto final.

Para manutenção da cultura foi usado meio de cultivo de Tris-Acetate-Phosphate (TAP), apresentado na Tabela 6, na proporção de 1:10, em erlenmeyeres de 250 mL a cada 10 dias foi realizado o repique do consórcio para garantir um cultivo estoque (GORMAN & LEVINE, 1965). O cultivo foi mantido em período integral sob aeração constante, com vazão de 1 L min⁻¹ de ar comprimido conduzido para cada erlenmeyer através de mangueira conectada a um dispersor de pedra porosa cilíndrica (22x12 mm) afim de misturar o meio de cultivo. Os experimentos foram mantidos à temperatura ambiente, em regime de luz contínua de 3910 lux.

Tabela 6. Composição do meio de cultivo TAP utilizado para a manutenção do consórcio de microalgas.

Solução estoque	Volume *	Componentes
Base Tris	2,42g/L	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃ Tris (hidroximetil-aminometano)
TAP	25mL/L	NH ₄ Cl MgSO ₄ 7H ₂ O CaCl ₂ 2H ₂ O
Solução de fosfato	1mL/L	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Elementos traço	1mL/L	Na ₂ EDTA 2H ₂ O ZnSO ₄ 7H ₂ O H ₃ BO ₃ MnCl ₂ 4H ₂ O FeSO ₄ 7H ₂ O CoCl ₂ 6H ₂ O
Ácido acético.	1mL/L	CuSO ₄ 5H ₂ O (NH ₄) ₆ MoO ₃ CH ₃ COOH

Optou-se pelo meio TAP, devido às concentrações disponíveis de fósforo e nitrogênio, impedindo que estes nutrientes fossem um fator limitante do crescimento, uma vez que o fósforo participa de processos energéticos como a fotossíntese, a respiração e o transporte de ATP, além da estrutura dos fosfolípidios e outras biomoléculas e o nitrogênio é fundamental no metabolismo da célula, pois está presente nos nucleotídeos, aminoácidos e pigmentos. Além disso, esse meio de cultura é estabelecido para as microalgas *Chlamydomonas* (um gênero de algas verdes, do qual fazem parte seres unicelulares flagelados), uma vez que uma análise prévia

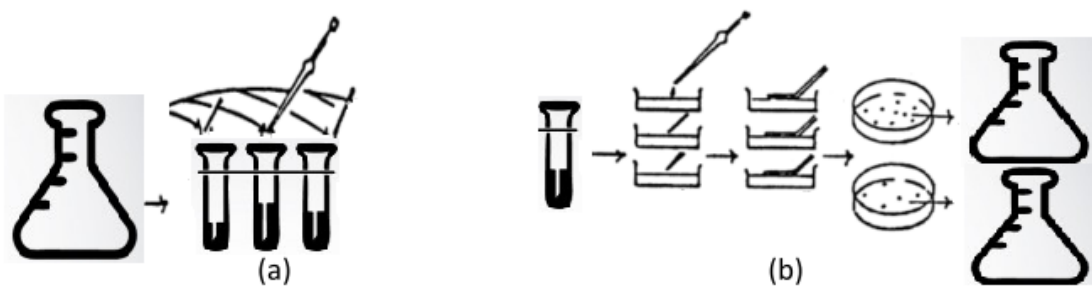
do consórcio de microalgas estudado permitiu identificar a presença de flagelos na maioria das microalgas (GORMAN & LEVINE, 1965).

3.1.2. Isolamento e Identificação da Microalga Predominante

O isolamento da espécie predominante foi realizado utilizando-se o método de diluições sucessivas no meio TAP, seguida de plaqueamento em meio Ágar, conforme proposto por LOURENÇO (2006). Estes métodos foram realizados sob condição fotoautotrófica de crescimento descritas a seguir.

A microalga foi isolada por técnica de diluição em série, na qual 1 mL do consórcio foi colocado em um tubo com 9 mL de meio TAP, após agitação foi retirado 1 mL do primeiro tubo e transferido para um segundo tubo com 9 mL de meio TAP, esse procedimento foi repetido por 3 vezes, em triplicata, e incubado para o crescimento por 10 dias. Ao fim dos 10 dias foi espalhada com uma alça bacteriológica uma alíquota dos tubos mais diluídos, em placas de Petri. Foram realizadas estrias nas placas contendo meio ágar BG11 e antibiótico Cloridrato de Tetraciclina 0,01% (m/v) diluído com meio TAP. As placas foram incubadas invertidas por 2 semanas sob luz para a formação de colônias. Após esse tempo, com o auxílio de uma alça foi coletada uma colônia isolada e colocada em Erlenmeyer com 50 mL de meio TAP para o crescimento. A Figura 2 mostra o esquema das etapas de isolamento.

Figura 2. Etapa de isolamento e purificação da microalga predominante. a) diluição sucessiva e b) plaqueamento



A identificação da espécie isolada foi efetuada com base em suas características morfológicas tendo como referência os trabalhos de Norris *et al.* (1980), Menezes e Bicudo (2008), González *et al.* (2015). As imagens foram capturadas utilizando microscópio biológico binocular equipado com equipamento de microfotografia acoplado ao computador.

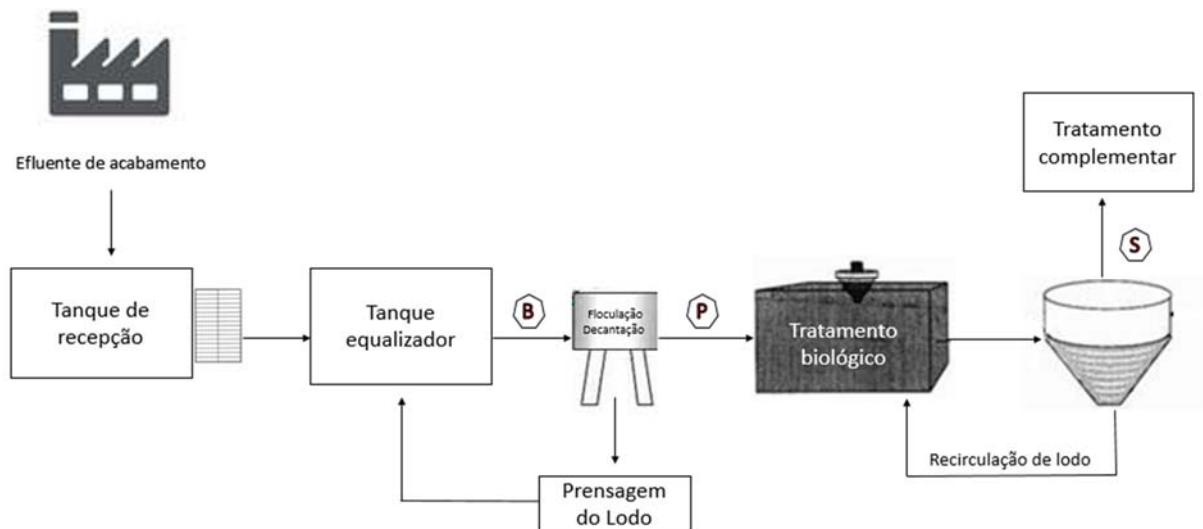
Todos os procedimentos de manutenção e inoculação nos efluentes da cultura foram realizados com vidraria e meio de cultura estéreis, dentro de uma capela de fluxo laminar vertical com sistema de filtração de ar e lâmpadas com radiação UV.

A fim de padronizar os experimentos de cultivos com efluentes, o consórcio de microalgas foi empregado após a fase de adaptação no meio de cultura TAP, ou seja, na fase exponencial de crescimento, padronizado no 5º dia, chamado de pré-inóculo, preparados a cada experimento. Para isso, os mesmos foram cultivados em erlenmeyeres de 1000 mL em meio TAP.

3.2 ETE e Efluentes Coletados

Para este trabalho foram utilizados os efluentes cedidos pelo curtume CBC Couros, de Novo Hamburgo RS, que processa couros nas etapas de acabamento molhado e acabamento final, onde são tratados 200-300 m³ de efluente/dia. O processo de tratamento de efluente no curtume CBC consiste de quatro etapas principais: pré-tratamento, tratamento primário físico-químico de coagulação/floculação/decantação, tratamento secundário biológico e tratamento complementar físico-químico de flotação. Um diagrama do processo é apresentado na Figura 3 para melhor compreensão das etapas citadas.

Figura 3. Diagrama do processo de tratamento de efluente do curtume com indicação das coletas dos efluentes B, P e S



O efluente gerado na empresa passa inicialmente por um peneiramento. Nesta etapa são removidos sólidos que ficam retidos na peneira, possibilitando a passagem do efluente para a lagoa aberta de equalização e correção do pH, onde a primeira amostra foi coletada, sem qualquer tipo de tratamento prévio, chamada de efluente bruto (B). Há também o líquido gerado

na prensagem do lodo gerado na decantação primária (em filtro-prensa) que retorna à lagoa de equalização com a função de corrigir o pH, uma vez que o efluente que chega na lagoa tem pH ácido e o líquido gerado na prensagem apresenta pH=12 por causa da cal adicionada no lodo.

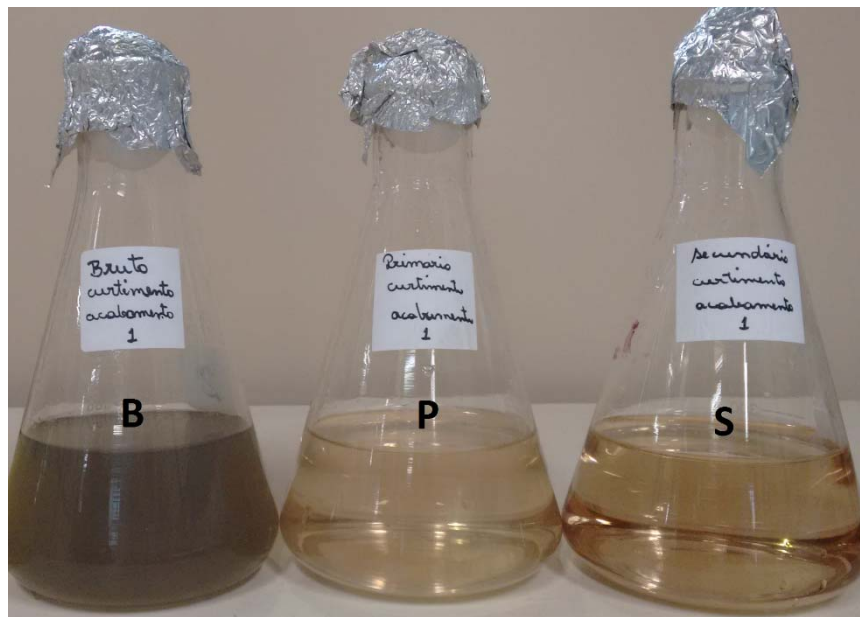
O efluente bruto segue para Tratamento Primário, em um tanque misturador, e então recebe cal e sulfato de alumínio para Floculação. Em seguida, é adicionado o polímero floculante, fazendo com que ocorra a decantação das partículas sólidas. A segunda coleta de efluente foi realizada após este tratamento primário de coagulação/floculação (P). O efluente é encaminhado para o Tratamento Secundário e o lodo do decantador primário recebe cal que facilita a prensagem.

No tratamento secundário ocorre a biodegradação da matéria orgânica e de compostos nitrogenados através de um tratamento biológico aerado de lodo ativado, seguido de nitrificação e desnitrificação. Na nitrificação, há injeção de ar pelo fundo do tanque, onde a amônia é oxidada e convertida a nitrato. Em uma segunda etapa ocorre a desnitrificação, onde o nitrato é convertido a nitrogênio gasoso em um tanque anóxico. Os tanques são dois conjuntos de concreto, um aeróbio e outro anóxico (30% efluente após o tratamento primário entra diretamente no tanque anóxico para suprir o carbono necessário). O próximo passo ocorre no decantador secundário, este com a função de separar os sólidos em suspensão (decantado) gerando o lodo ativado que retorna ao tratamento biológico e um efluente clarificado. Uma terceira amostra foi coletada após o tratamento biológico de lodos ativados e decantação, ou seja, efluente secundário (S).

Por fim, é feito o tratamento terciário que consiste em um processo físico-químico de flotação. Nesta técnica, bolhas de ar são injetadas no fundo de um tanque de forma que as bolhas aderem às partículas em suspensão no líquido sendo o material suspenso levado para a superfície e então arrastadas, para isso é feita a adição de um polieletrólito floculante. Este processo visa remover o restante de lodo presente no efluente antes que o mesmo seja descartado no corpo receptor.

Os efluentes foram coletados em dois momentos, a primeira coleta foi realizada em agosto de 2016 (Figura 4), e o efluente foi usado na primeira e segunda etapas experimentais; e a segunda coleta foi em fevereiro de 2017 e o efluente foi usado na terceira e quarta etapas experimentais desta dissertação.

Figura 4. Efluentes de curtume: bruto (B), após a coagulação/floculação (P), amostra, após o tratamento biológico de lodos ativados (S)



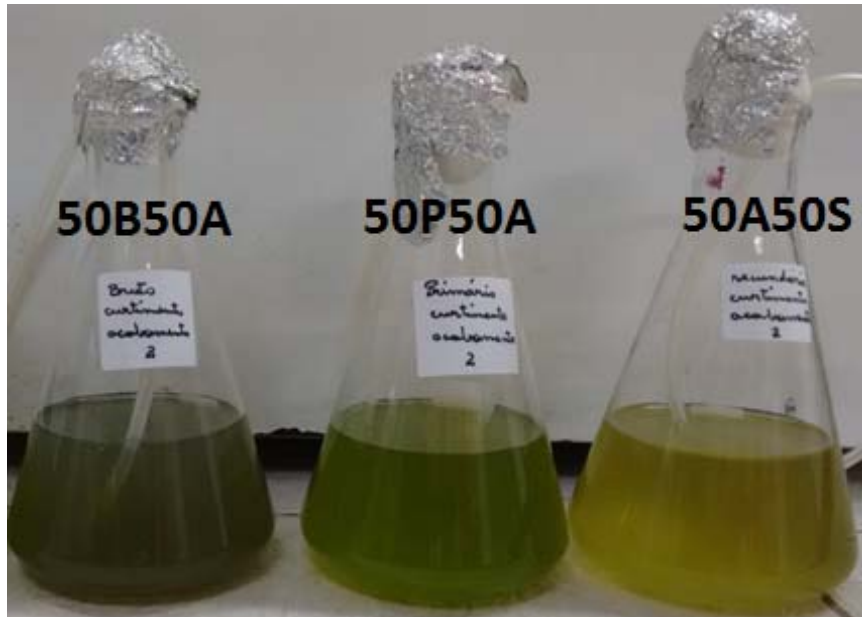
3.3. Experimentos de Cultivos em Efluentes

Todos os cultivos deste trabalho foram realizados em duplicatas e mantidos sob aeração constante com vazão de 1 L min^{-1} de ar comprimido em temperatura ambiente, e em caso de cultivos fotoautotrófico e mixotrófico foram empregadas lâmpadas fluorescentes com intensidade luminosa 8100 Lux. A biomassa foi quantificada (item 3.4 abaixo) a cada 24 horas em cada cultivo. Foram feitas análises dos efluentes após a montagem dos sistemas de efluente com o pré-inóculo e após o final do cultivo, para quantificar as remoções de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT), carbono total (CT), carbono inorgânico (CI), amônia (N-NH_3), fósforo (FT), DQO e DBO. Os quatro experimentos de cultivos em efluentes são descritos abaixo.

3.3.1. Testes dos efluentes

Na primeira etapa experimental foram testados os efluentes B, P e S como meios de cultivos para o consórcio de microalgas. Estes experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 1000 mL. Em cada Erlenmeyer foram adicionados: (i) 225 mL de efluente; (ii) 225 mL de água destilada; (iii) 50 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 500 mL, sendo chamados 50B50A, 50P50A e 50S50A, respectivamente (Figura 5). Este experimento foi realizado sob luz contínua durante 16 dias.

Figura 5. Efluentes 50B50A, 50P50A e 50S50A após a adição do pré-inóculo



3.3.2 Cultivo em diferentes composições dos efluentes

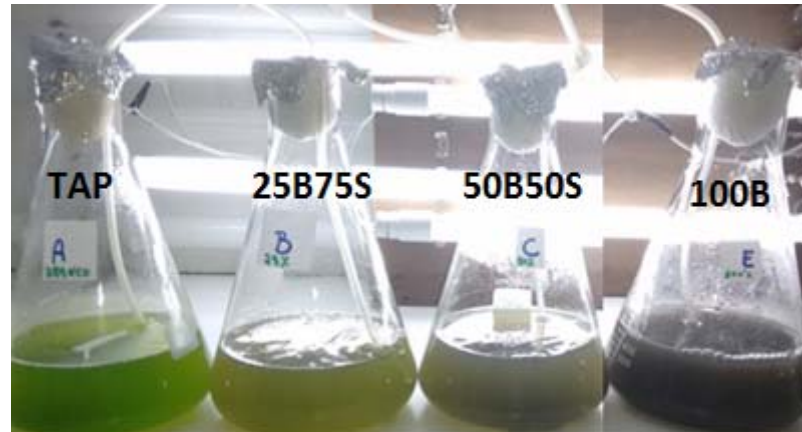
Tendo em vista a etapa anterior foi escolhido trabalhar nas próximas etapas com o efluente bruto misturado com o efluente secundário. Evitando o uso de água limpa para as diluições e sendo uma forma sustentável de reutilizar a água tratada e promover o tratamento do efluente.

A segunda etapa do trabalho, teve como objetivo analisar o efluente bruto misturado com o efluente secundário (S) nas seguintes proporções:

- 25% bruto/75% efluente secundário (25B75S): (i) 112,5 mL do efluente bruto; (ii) 337,5 mL de efluente secundário; e, (iii) 50 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 500 mL.
- 50% bruto/50% efluente secundário (50B50S): (i) foram adicionados 225 mL do efluente bruto; (ii) 225 mL de efluente secundário e, (iii) 50 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 500 mL.
- 100% bruto (100B): (i) foram adicionados 450 mL do efluente bruto; e, (ii) 50 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 500 mL.
- Meio de cultura TAP: (i) 450 mL de meio de cultura; e, (ii) 50 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 500 mL.

Este experimento foi realizado sob luz contínua durante 19 dias. A Figura 6 ilustra estes cultivos realizados.

Figura 6. Cultivo em meio TAP, 25B75S, 50B50S e 100B (da direita para a esquerda)



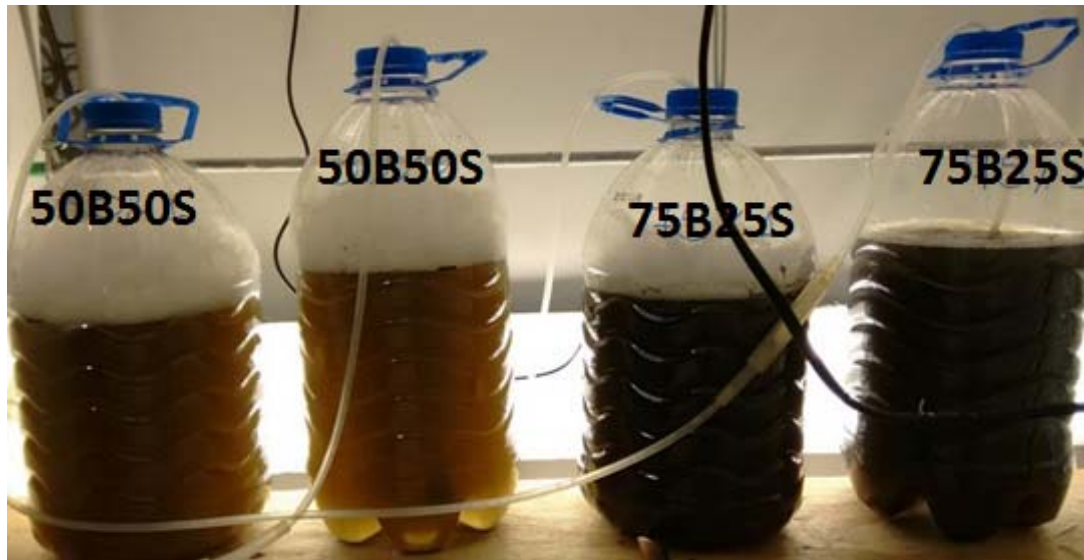
3.3.3 Avaliação dos tipos de cultivo quanto a disponibilidade de luz

A terceira etapa do trabalho seguiu com os efluentes (50B50S) e (75B25S) em duplicatas e em escala maior. Nesta etapa foram realizados os cultivos autotróficos, heterotrófico e mixotrófico em frascos de 5.000 mL durante 19 dias para as seguintes composições de efluentes:

- 50% bruto/50% efluente secundário (50B50S): (i) foram adicionados 1.800 mL do efluente bruto; (ii) 1.800 mL de efluente secundário; e, (iii) 400 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 4.000 mL.
- 75% bruto/25% efluente secundário (75B25S): (i) foram adicionados 2.700 mL do efluente bruto; (ii) 900 mL de efluente secundário; e, (iii) 400 mL do pré-inóculo do consórcio de microalgas, totalizando 4.000 mL.

No cultivo fotoautotrófico os cultivos com os efluentes 50B50S e 75B25S foram mantidos sob luz contínua. A foto de cultivo fotoautotrófico está apresentado da Figura 7.

Figura 7. Cultivo fotoautotrófico com os efluentes compostos 50B50S e 75B25S em duplicatas.



No cultivo mixotrófico os efluentes (50B50S) e (75B25S) foram mantidos 12 horas sob luz e 12 horas no escuro. No cultivo heterotrófico os efluentes (50B50S) e (75B25S) foram mantidos no escuro durante todo o cultivo.

3.3.4. Cultivo fotoautotrófico com a microalga isolada

Na quarta e última etapa, foi cultivada a microalga isolada *Tetraselmis sp.* com luz contínua (fotoautotrófico), nas composições de (50B50S) e (75B25S) em frascos de 5000 mL. Ao final destes cultivos foi avaliado o rendimento de lipídio na biomassa.

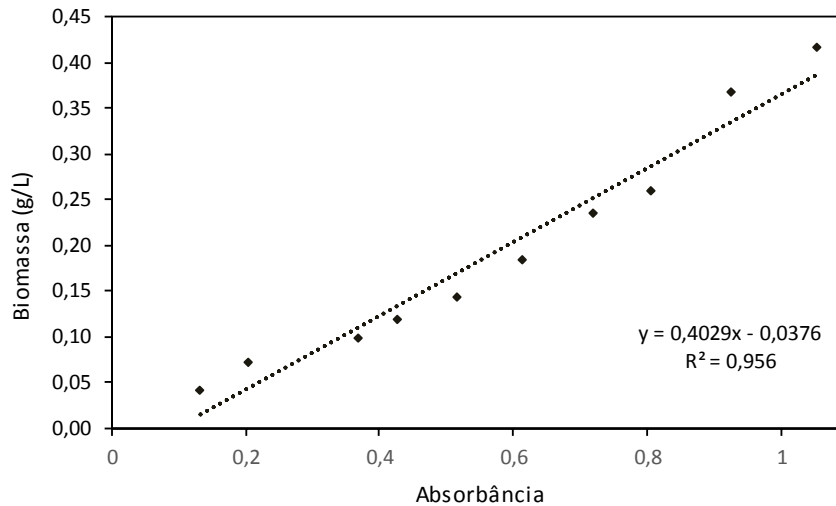
3.4 Determinação de Biomassa

Para analisar o crescimento do consórcio, foi realizado inicialmente uma varredura no espectrofotômetro UV-VIS T80 de PG Instruments Ltda. (Leicester, LEC, UK), que consistiu em uma varredura de absorção no intervalo do espectro eletromagnético correspondente à luz visível, permitindo achar o comprimento de onda com maior absorbância (Abs), o qual foi 570 nm.

Em seguida, para obtenção da concentração de biomassa, realizaram-se diluições da amostra (consórcio de microalgas e meio de cultura TAP), em balões de 10 mL, para atingir absorbâncias entre 0,1 a 1,0, e proceder a leitura da densidade ótica a 570 nm. Após, as amostras foram filtradas e secas até peso constante para quantificação da biomassa (g L^{-1}) e relacionadas à absorbância. Com esses valores foi criada uma curva de calibração (Abs x concentração),

representada na Figura 8, e através da Equação 1 gerada tornou-se possível o cálculo da concentração através de medidas de Abs.

Figura 8. Curva de calibração com dados de medidas diretas de crescimento



$$y = 0,4029x - 0,0376 \quad (1)$$

Onde y é a concentração de biomassa (g L^{-1}) e x é absorbância.

A concentração de biomassa (g L^{-1}) foi determinada coletando uma amostra de 10 mL a cada 24 h em todos os experimentos de cultivos para leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 570 nm.

3.5 Análises dos Efluentes

Foram feitas análises dos efluentes após a montagem de todos os sistemas de efluente com o pré-inóculo e após o final do cultivo, para avaliar de remoções de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT), carbono total (CT), carbono inorgânico (CI), amônia (N-NH_3), fósforo (FT), DQO e DBO.

Na etapa 1 foram analisadas no início e ao fim dos experimentos as quantidades de nitrogênio total (NT), amônia (N-NH_3), fósforo (FT).

Para a etapa 2 foram analisadas no início e ao fim dos experimentos as quantidades de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT), amônia (N-NH_3), fósforo (FT), DQO e DBO.

Para as etapas 3 e 4 foram analisadas no início e ao fim dos experimentos as quantidades de nitrogênio total (NT), carbono orgânico total (COT), amônia (N-NH_3), fósforo

(FT), DQO e DBO. Também foram realizadas análises durante os experimentos, para avaliar remoção de NT, COT, CT, CI, FT e amônia ao longo dos dias de cultivo.

As amostras coletadas foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo em microfiltros de fibra de vidro (MN GF-3), com poros de 0.6 µm.

As análises foram realizadas em duplicatas e a remoção do composto foi calculada pela Equação 2:

$$R(\%) = \frac{x_i - x_f}{x_i} \times 100 \quad 2$$

Onde x_i é a concentração inicial do composto, x_f é a concentração final e R é remoção em % do composto. As análises realizadas são descritas a seguir.

3.5.1 pH

Foram realizadas medidas de pH, do efluente após a adição do pré-inóculo e ao longo de todos os cultivos através de pHmetro (Digimed DM-22).

Na primeira etapa dos experimentos também foram realizadas medidas de pH durante os dias de cultivo.

3.5.2 Determinação de Amônia

A quantificação de amônia (N-NH₃) presente no cultivo foi analisada no Cromatógrafo Iônico (Basic IC Plus Package, Metrohm), utilizando a coluna Metrosep C4-150, eluente HNO₃ 2,5 g L⁻¹ e ácido dipicolínico 1,5 g L⁻¹ com um fluxo de 0,9 mL min⁻¹.

3.5.3 Determinação de fósforo

O fósforo foi identificado segundo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). A análise do efluente seguiu o método colorimétrico com quantificação utilizando espectrofotômetro UV/VIS. Primeiramente reage-se o ortofosfato com o chamado reagente combinado: ácido ascórbico, molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio e a amostra, formado o complexo antimônio-fosfato-molibdato que é reduzido com o ácido ascórbico para formar uma coloração azul característica do complexo de molibdênio. A quantificação da amostra digerida, ou seja, que contem fósforo é feita em espectrofotômetro, com comprimento de onda 880 nm, e a intensidade da cor é proporcional à concentração de ortofosfato disponível.

3.5.4 Análise de DBO e DQO

A DBO foi medida com o equipamento VELP Scientifica DBO System 6. Foram adicionados 250 mL de amostra (diluição 1:20) juntamente com 1 mL de uma solução 0,025 N

de sulfito de sódio (Na_2SO_3) para remoção de cloro livre e combinado, 1 mL de solução de cloridrato de 2-cloro-6 (triclorometil) piridina a 0,35% para inibição da nitrificação, 2 mL de sementes bacterianas (lodos de curtumes) e 1 mL de um tampão para fornecimento de nutrientes composto por 0,25 mL de 0,25 g L^{-1} de $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mL de solução de CaCl_2 (27,5 g L^{-1}), 0,25 mL de solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 22,5 g L^{-1} e 0,25 mL de tampão com 8,5 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 33,4 g L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21,7 g L^{-1} de K_2HPO_4 e 1,7 g L^{-1} de NH_4Cl . As lentilhas de hidróxido de potássio (KOH) foram utilizadas para preencher o recipiente alcalino para a absorção de dióxido de carbono. As amostras foram incubadas (Eletrolab EL202/3) a 20°C durante 5 dias.

A demanda química de oxigênio (DQO) é a medida do consumo de oxigênio necessário para oxidar material redutor orgânico ou inorgânico presentes nas águas residuárias. A análise de DQO foi realizada conforme descrito pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). A metodologia consiste na oxidação a quente, com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em meio fortemente ácido. A análise de DQO foi realizada segundo procedimento descrito pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2005). Este método permite uma medida rápida do teor de material redutor, principalmente do orgânico.

3.5.5 Determinação de carbono e nitrogênio total

As determinações de carbono orgânico total (COT), carbono inorgânico (CI), carbono total (CT) e nitrogênio total (NT) das amostras foram realizadas em um analisador de carbono orgânico total (TOC-L Shimadzu) equipado com unidade de medição de nitrogênio total (TNM-L Shimadzu and 8-port sampler (OCT-L Shimadzu).

3.5.6 Determinação da quantidade de lipídios na biomassa

O protocolo para determinação da quantidade de lipídios foi baseado no método de Bligh e Dyer (1959) utilizando as quantidades sugeridas por Manirakiza *et al.* (2001), realizados em triplicata. Este método extrai os lipídios polares e não polares da biomassa utilizando uma mistura de metanol e clorofórmio sendo a quantificação feita por gravimetria. O método foi realizado em triplicatas através das 4 etapas:

- (i) *Digestão ácida da biomassa*: é realizada para romper e/ou permear a parede celular do microrganismo e liberar os lipídios intracelulares. Desta forma, a biomassa foi submetida a calor em estufa a $60 \pm 10^\circ\text{C}$ por 12 horas. Em seguida, foi macerada e mantida em dessecador para pesagem em balança de precisão 0,1 g. Após foi digerida

em HCL 2M em banho de água à 80°C por 1 hora e concentrada em centrífuga (SOLAB, SL-700), a 2000 rpm por 15 minutos. O líquido sobrenadante foi descartado.

(ii) *Extração dos lipídios*: a extração é realizada em três etapas diferentes, na primeira utiliza-se uma relação 2:1 metanol-clorofórmio, em seguida uma relação 1:1, finalmente é feita uma re-extração da biomassa, todas estas etapas foram seguidas de agitação.

(iii) *Evaporação do clorofórmio*: nesta etapa é obtido o extrato (lipídio e clorofórmio), retirando o excesso de solvente em rotaevaporador e finalmente seco em estufa.

(iv) *Pesagem do lipídio final*: o lipídio obtido é pesado em balança analítica, estabelecendo-se o conteúdo de lipídios da biomassa total (%) relacionando as massas de lipídio e de biomassa utilizada na extração.

O teor de lipídio (% de lipídios na biomassa seca) foi determinado de acordo com a Equação 3:

$$\text{Teor de lipídeo \%} = \frac{mpf - mp}{mb} \times 100 \quad 3$$

Onde *mpf* é a massa final (placa de petri mais lipídios), *mp* é a massa da placa de petri e *mb* é a biomassa inicial.

Capítulo 4

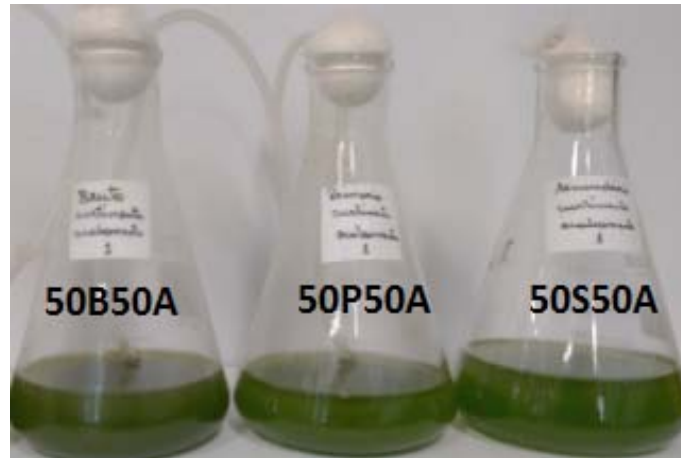
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos ao longo da realização deste trabalho, os quais são analisados e comparados com outras referências. Este capítulo, assim como o anterior está estruturado em quatro etapas: na primeira são mostrados os dados da coleta dos efluentes, do consórcio de microalgas e avaliação do efluente a ser usado no passo seguinte. Na segunda parte, são apresentados e discutidos os resultados do cultivo do consórcio de microalgas no efluente em distintas composições. Na terceira, é analisado o cultivo heterotrófico, fotoautotrófico e mixotrófico do consórcio em diferentes composições. A quarta e última etapa, refere-se ao isolamento e identificação da microalga predominante e aos resultados obtidos no cultivo fotoautotrófico em diferentes composições e a quantificação de lipídios na biomassa obtida.

4.1 Teste dos efluentes

Na Figura 9 é apresentado o consórcio de microalgas ao final dos 16 dias de cultivo realizados com os efluentes 50B50A, 50P50A e 50S50A. Os dados de absorvância, coletados durante os 16 dias de cultivo nos efluentes, permitiram o cálculo das concentrações médias de biomassa (Figura 10). A máxima concentração de biomassa foi obtida no 16º dia ($1,77 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$) para 50P50A. Estes resultados foram similares aos valores encontrados por Zittelli *et al.* (2006) cultivando a espécie *Tetraselmis suecica*, que produziu $1,73 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa em reator de coluna de 120 L.

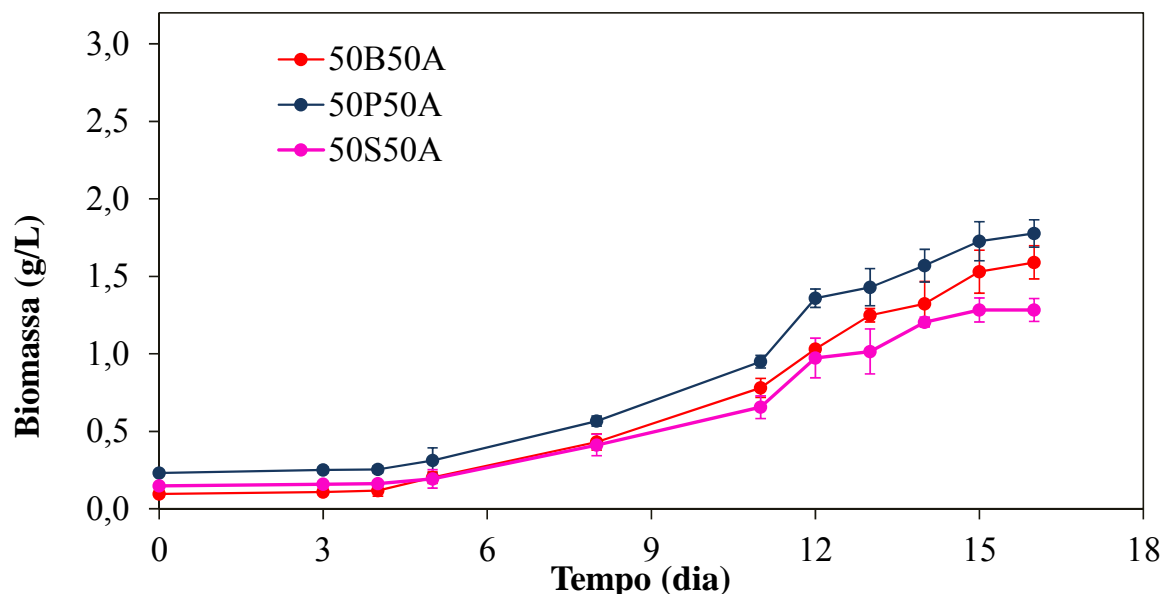
Figura 9. Cultivos de microalgas após 16 dias nos efluentes 50B50A, 50P50A e 50S50A colocados da esquerda para a direita



Os resultados encontrados neste estudo confirmam os fatos evidenciados por Pittman *et al.* 2011, onde é relatado que várias espécies de microalgas são capazes de crescer nas condições encontradas em águas residuais, devido à capacidade que possuem de utilizar carbono orgânico e inorgânico, nitrogênio e fósforo inorgânicos disponíveis, podendo variar o crescimento de acordo com as proporções destes constituintes.

É possível verificar que o consórcio foi capaz de crescer em todos os efluentes testados. Além disso, observou-se uma fase de adaptação do consórcio nos efluentes até o 4º dia de cultura. O maior crescimento foi observado para 50B50A. Se deve provavelmente, pois o efluente bruto B, sem qualquer tratamento, oferece maiores quantidades de nutrientes do que o efluente primário P e o secundário S. Após o 12º dia de cultivo, a curva de crescimento começou a entrar na fase estacionária para 50P50A e 50S50A, indicando que eles estavam entrando em fase estacionária.

Figura 10. Crescimento médio de microalgas em efluentes de curtumes 50B50A, 50P50A e 50S50A.



Os resultados das análises de poluentes dos meios no início e após 16 dias de cultivo e as remoções, são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Fósforo (P-PO₄), Nitrogênio total (NT) e Amônia (N-NH₃) dos efluentes B, P e S diluídos antes e após o tratamento com microalgas.

Parâmetro		50B50A ¹		50P50A ¹		50S50A ¹	
		Conc. ² [mg L ⁻¹]	Remoção [%]	Conc. ² [mg L ⁻¹]	Remoção [%]	Conc. ² [mg L ⁻¹]	Remoção [%]
P-PO ₄	CI ³	2,16±0,03	84,72	2,06±0,04	88,35	2,06 ±0,03	91,75
	CF ⁴	0,33±0,02		0,24±0,03		0,17±0,02	
NT	CI ³	155,40±0,39	82,88	140,00±0,21	76,00	127,40±0,03	74,73
	CF ⁴	26,60±0,12		33,60±0,14		32,20±0,12	
N-NH ₃	CI ³	53,90±1,11	100	58,54±0,49	100	49,66±1,10	100
	CF ⁴	N.D. ⁵		N.D. ⁵		N.D. ⁵	

¹Efluentes B, P e S diluídos com 50% em água destilada ²Concentrações ³Concentração inicial ⁴Concentração final ⁵ Não determinado.

Os resultados demonstraram que as remoções para os três efluentes testados não apresentam grandes variações. Os valores mais altos de remoção foram de 82,88% e 91,75% para NT e P-PO₄⁻, para P e S respectivamente.

As concentrações de N-NH₃ para o período final foram inferiores ao limite de detecção pelo método de cromatografia iônica (0,05 mg L⁻¹), indicando que as remoções foram 100%. Este resultado está de acordo com os dados encontrados por Sun e Simsek (2017), que relataram 99,0% de amônia removida das águas residuais domésticas após 21 dias cultivo. A assimilação de nitrogênio por microalgas é realizada sob a forma de nitratos, nitritos e

principalmente amônia. A amônia é facilmente absorvida pelas microalgas porque é a forma mais reduzida de compostos de nitrogênio ou pode ser nitrificada para nitrato. De acordo, com Perez-Garcia *et al.* (2011), a ordem de assimilação do nitrogênio preferencialmente pelas microalgas é: $N-NH_4^+ > N-NO_3^- > N-NO_2^- > \text{ureia}$, pois a forma $N-NH_4^+$ requer menos energia para ser assimilada.

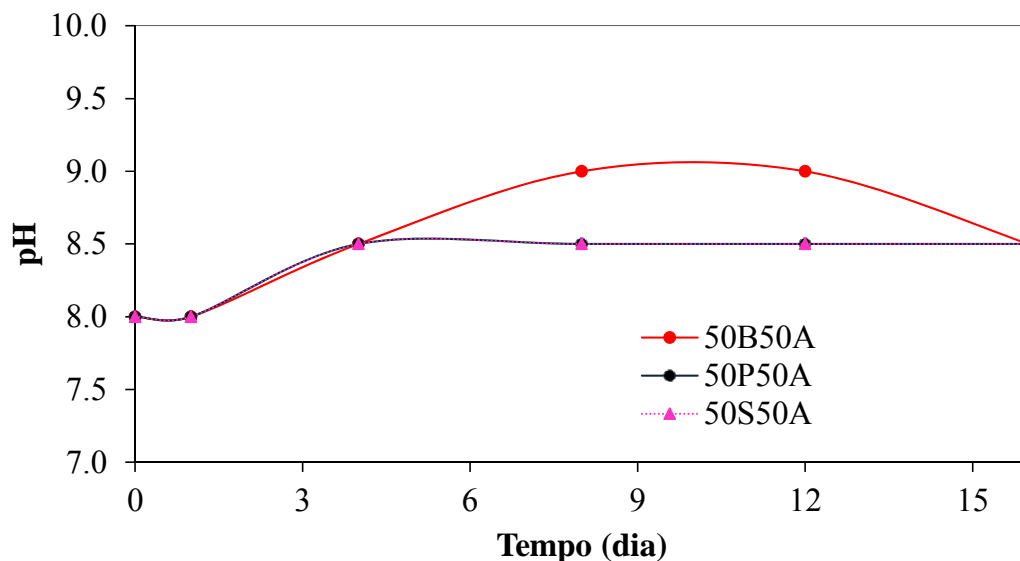
O fósforo é tão importante quanto o nitrogênio no cultivo de microalgas, é consumido principalmente em forma inorgânica e com a ajuda de enzimas em sua forma orgânica. É um elemento essencial para que ocorra a síntese do DNA (CHO *et al.*, 2011).

O pH inicial dos efluentes não foi ajustado antes da inoculação. Os valores de pH apresentaram variação para todos os testes ao longo do tratamento (Figura 11). Uma elevação do pH (de 8,0 a 8,5) nos primeiros dias de cultivo sugere um aumento no rendimento fotossintético.

O aumento da alcalinidade do meio de cultura é devido a realização da fotossíntese através do consumo de dióxido de carbono pelas microalgas e consequentemente aumento do crescimento e produção de biomassa.

A elevação do pH favorece a maior presença de NH_3 (amônia livre). No pH próximo a 9,5, aproximadamente 50 % da amônia encontra-se na forma de amônia livre que facilmente volatiliza e 50 % na forma de NH_4^+ . Em pH acima de 11 toda amônia está na forma de NH_3 (VON SPERLING, 2002). Porém o uso de tampão para manter o pH em valores constantes, não foi uma possibilidade testada, uma vez que é preciso usar altas concentrações, acarretando em custos elevados no processo.

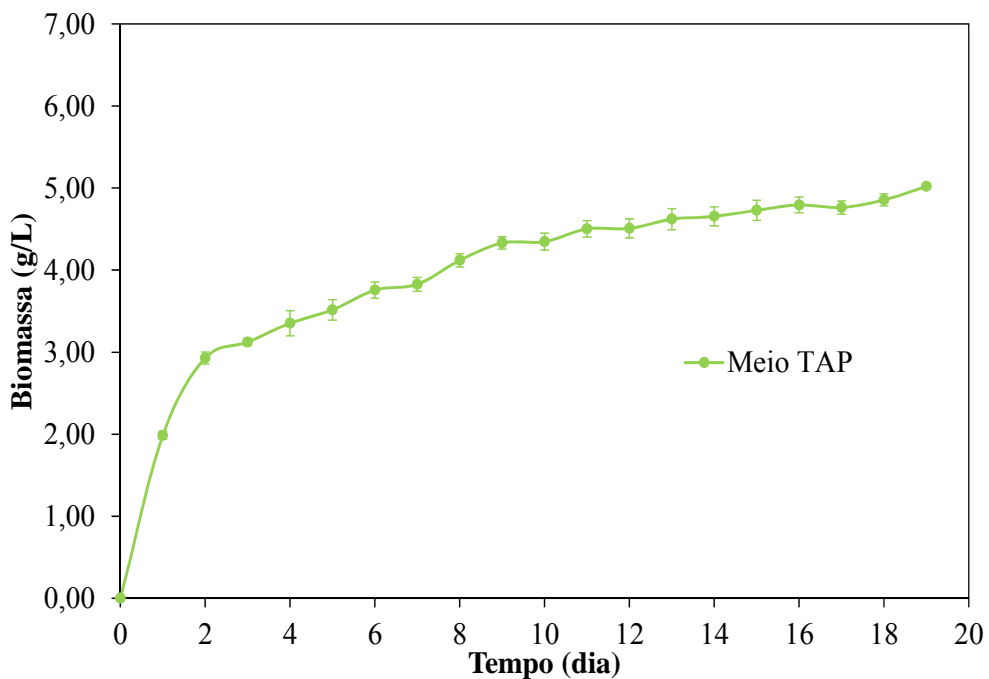
Figura 11. Variação do pH nos efluentes diluídos 50B50A, 50P50A e 50S50A durante 16 dias



Os experimentos seguintes foram realizados com o efluente bruto B, rico em nutrientes, já que as remoções de nutrientes anteriormente verificadas foram próximas entre os efluentes testados, ou seja, buscou-se tratar o efluente diretamente com as microalgas. Nesta etapa, evitou-se a diluição com água, assim foram preparados efluentes compostos misturando efluente bruto B e efluente após o tratamento biológico secundário S, para reduzir a concentração de poluentes.

A concentração de biomassa média durante o cultivo em meio TAP e nas misturas compostas de efluentes 25B75S, 50B50S, 100B são apresentadas na Figura 12 e na Figura 13, respectivamente.

Figura 12. Biomassa microalgal durante o cultivo do consórcio em meio TAP



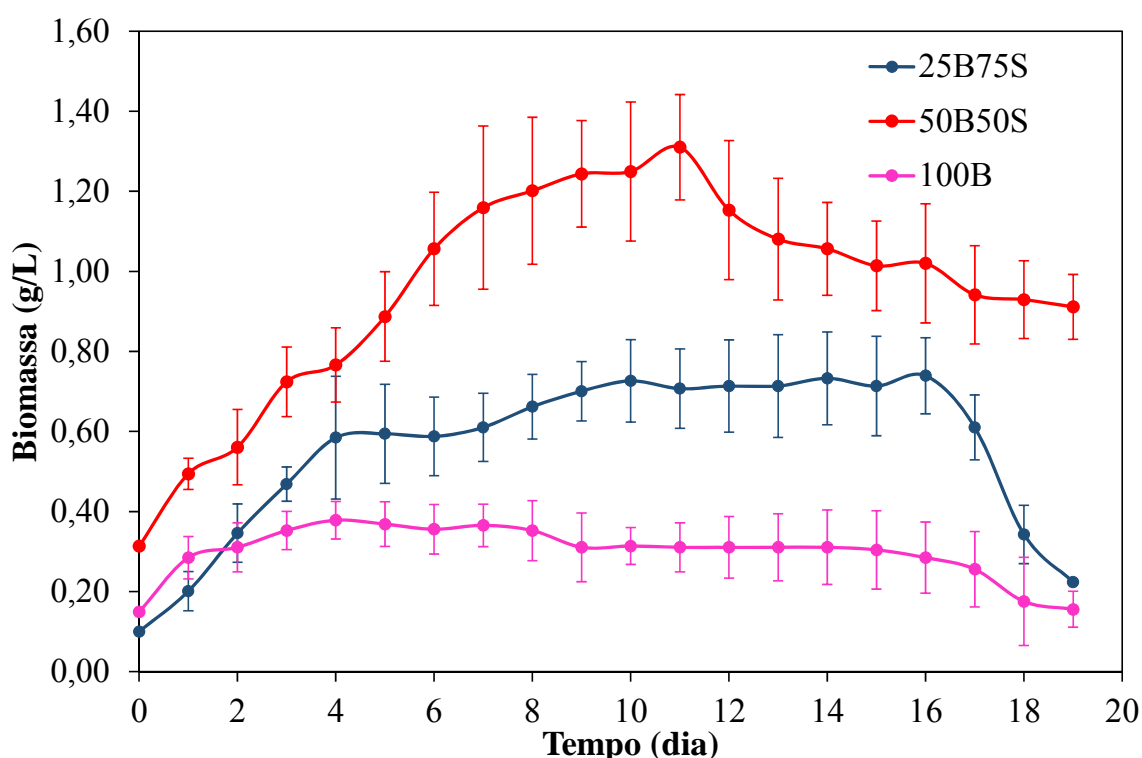
É possível notar que o crescimento de biomassa foi maior para 50B50S chegando a $1,31 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$. Os valores obtidos no efluente composto 25B75S apresentaram-se inferiores aos valores de biomassa para o meio de cultura TAP e 50B50S, o que mostra a falta de nutrientes para o crescimento do consórcio nesta condição.

No efluente 100B o crescimento de biomassa apresentou-se menor que os demais. Os cultivos 25B75S e 50B50S obtiveram maior crescimento quando comparados ao efluente 100B.

No efluente composto 50B50S, a partir do 11º dia, o crescimento mostrou um pequeno declínio, diferentemente do 25B75S, que teve um declínio rápido a partir do 16º dia,

o que demonstra que nesta condição em que o efluente bruto estava em menor proporção houve falta de nutrientes para continuar o desenvolvimento do consórcio. No 4º dia no efluente 100B, o consórcio de microalgas começou a entrar no estágio da morte celular, isso pode ser explicado por ser um efluente escuro, onde a entrada de luz foi dificultada, e também porque apesar do efluente bruto ser mais rico em nutrientes, também tem maior concentração de poluentes, tornando-o inviável para o tratamento de efluentes.

Figura 13. Crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo em efluentes 100B, 50B50S e 25B75S.



As concentrações médias iniciais e finais de P-PO₄, NT, N-NH₃, COD, TOC, DBO e pH são mostradas na Tabela 8.

Os resultados mostraram alta remoção de nitrogênio amoniacal (aproximadamente 100%) para as condições de cultivo nos efluentes compostos 25B75S e 50R75S e somente 48,50% de remoção para 100B. As remoções mais elevadas de nitrogênio total, 86,56% e 79,36%, também foram verificadas para as condições de 25B75S, 50B50S, respectivamente. Uma baixa remoção total de nitrogênio de 22,18% foi observada para a condição 100B. Observou-se também a redução da concentração de fósforo ao longo do cultivo, uma vez que foi alcançado 87,82% de remoção para a condição 50B50S seguida de 75,86% para 25B75S. De acordo com os resultados, a remoção de fósforo, DQO, TOC e nitrogênio total foram mais eficientes no efluente 50B50S do que no efluente 25B75S.

Tabela 8. Parâmetros médios dos efluentes 25B75S, 50B50S e 100B, antes e após o tratamento com microalgas durante 19 dias

Parâmetros		25B75S ¹		50B50S ²		100B ³	
		Conc ⁴ . [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁴ . [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁴ . [mg l ⁻¹]	Remoção %
pH	CI ³	8,14		8,20		7,51	
	CF ⁴	8,85		9,24		9,0	
P-PO₄	CI ³	1,45±0,09	75,86	2,38±0,12	87,82	4,67±0,11	14,99
	CF ⁴	0,35±0,09		0,29±0,08		3,97±0,04	
NT	CI ³	69,20±0,53	86,54	122,64± 1,02	79,36	262,30± 0,64	18,37
	CF ⁴	09,30±0,25		25,31± 0,67		214.10±0,37	
N-NH₃	CI ³	18,31±0,46	99,9	39,80±0,97	99,9	91,09± 1,27	48,50
	CF ⁴	N.D. ⁷		N.D. ⁷		46,91±1,10	
DQO	CI ³	525,00±1,03	33,76	1340,00±1,89	35,82	2450,00±1,90	15,14
	CF ⁴	414,00±0,83		860,00±0,67		2079,00±1,04	
COT	CI ³	49,80±0,76	11,04	96,21±1,17	14,26	202,2,0±0,98	0,15
	CF ⁴	44,30±0,56		82,49± 1,36		201,9,0±0,43	
DBO	CI ³	690,00±7,07	49,35	1540,00±14,14	42,82	2790,00±1,95	8,14
	CF ⁴	349,50±1,53		880,00±2,31		2563,00±1,60	

¹25% Bruto diluído com 75% Secundário (25B75S); ²50% Bruto diluído com 50% Secundário (50B50S); ³100% de efluente bruto (100B); ⁴Concentrações; ⁵Concentração inicial; ⁶Concentração final, ⁷Não determinado.

4.2 Avaliação dos tipos de cultivo quanto a disponibilidade de luz

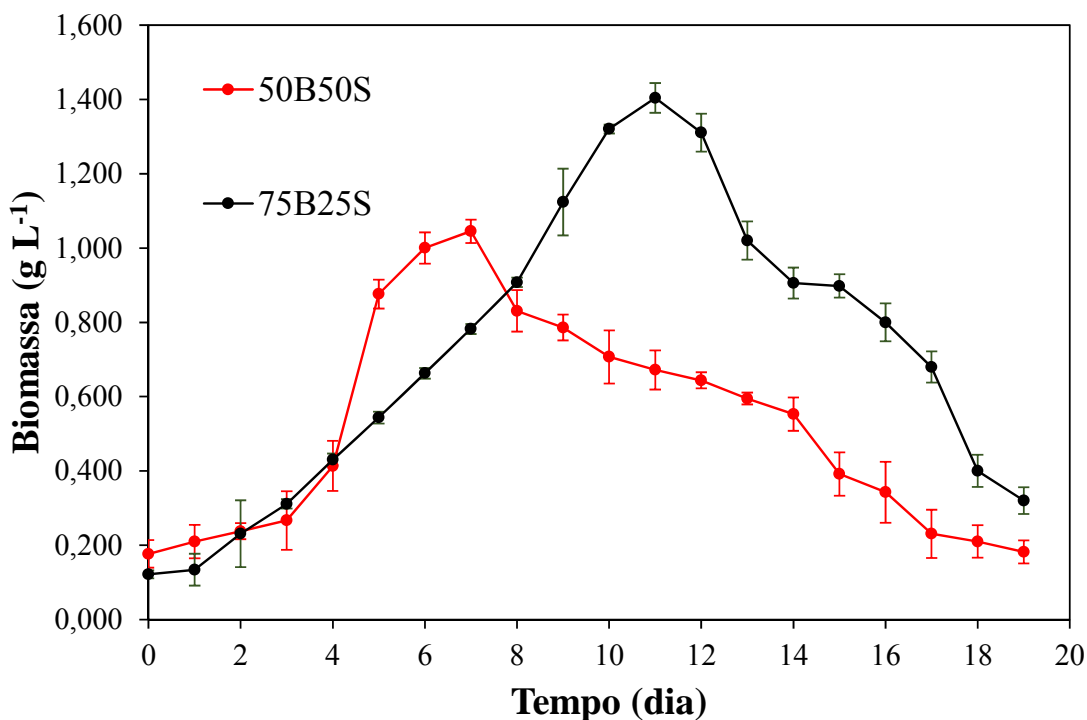
Diante dos valores de remoção encontrados, decidiu-se trabalhar com o efluente bruto B em composições de 50% e 75% misturado com efluente após o tratamento biológico S, para testar a influência dos fotoperíodos nos cultivos. Optou-se por estas composições uma vez que não houve crescimento considerável no efluente 100B, enquanto no efluente 25B75S houve escassez de nutrientes para crescimento.

4.2.1 Cultivo Fotoautotrófico

As concentrações biomassa ao longo dos 19 dias de cultivo fotoautotrófico para 50B50S e 75B25S são apresentadas na Figura 14. A biomassa máxima do consórcio de microalgas no cultivo fotoautotrófico foi 1,40 g L⁻¹ no 11º dia, para o 75B25S. Para 50B50S a maior concentração foi de 1,04 g L⁻¹ atingida no 6º dia. Os diferentes valores encontrados com relação ao experimento da Tabela 8 para o efluente 50B50S pode ser explicado, por se tratar de nova coleta de efluentes, o que acarretou em concentrações diferentes de nutrientes e até mesmo uma carga química diferente que influenciam no crescimento do consórcio de microalgas.

O crescimento fotoautotrófico é promovido por meio da fotossíntese, empregando a luz como fonte de energia, a qual é convertida em energia química. Neste tipo de cultivo, observa-se uma relação direta entre a atividade fotossintética e o crescimento do microrganismo (HATA *et al.*, 2000; BONINI, 2012). A concentração 75B25S favoreceu o crescimento do consórcio de microalgas, isso pode ser explicado pelas maiores concentrações de nutrientes neste efluente. A maioria das espécies de microalgas são autotróficas obrigatórias, não crescendo na ausência de luz e dióxido de carbono (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Figura 14. Crescimento médio do consórcio de microalgas em cultivo fotoautotrófico em efluentes de curtume nas composições 50B50S e 75B25S.



O crescimento fotoautotrófico é promovido por meio da fotossíntese, empregando a luz como fonte de energia, a qual é convertida em energia química. Neste tipo de cultivo, observa-se uma relação direta entre a atividade fotossintética e o crescimento do microrganismo (HATA *et al.*, 2000; BONINI, 2012). A concentração 75B25S favoreceu o crescimento do consórcio de microalgas, isso pode ser explicado pelas maiores concentrações de nutrientes neste efluente. A maioria das espécies de microalgas são autotróficas obrigatórias, não crescendo na ausência de luz e dióxido de carbono (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

As concentrações médias iniciais e finais P-PO₄, TKN, N-NH₃, COD, TOC e DBO e pH inicial e final são mostradas na Tabela 9.

Foram obtidos valores de remoção maiores no efluente composto 75B25S para todos os parâmetros analisados, exceto para o fósforo que teve uma remoção maior no efluente 50B50S.

Tabela 9. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25S antes e após o cultivo fotoautotrófico com o consórcio de microalgas.

Parâmetros		50B50S ²		75B25S ³	
		Conc ⁴ [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁴ [mg l ⁻¹]	Remoção %
pH	CI ³	7,98		8,07	
	CF ⁴	8,66		9,06	
P-PO ₄	CI ³	8,66	96,54	9,06	95,53
	CF ⁴	0,04±0,00		0,152±0,0042	
NT	CI ³	103,80±0,31	71,54	148,22±2,03	74,89
	CF ⁴	29,54±3,83		61,01±0,43	
N-NH ₃	CI ³	69,69±2,46	100	82,74±0,37	100
	CF ⁴	N.D. ⁶		N.D. ⁶	
DQO	CI ³	814,00±28,28	50,37	1120,0±0,0	56,70
	CF ⁴	404,0±28,28		485,0±7,07	
TOC	CI ³	87,18±2,95	20,03	103,59±4,96	30,23
	CF ⁴	69,92±1,82		72,27±4,24	
DBO	CI ³	11300±28,28	16,81	1330,0±28,28	20,68
	CF ⁴	940,0±14,14		1055,0±7,07	

¹50% Bruto diluído com 50% Secundário (50B50S); ²75% Bruto diluído com 25% Secundário (75B25S);

³Concentração inicial; ⁴ Concentração final, ⁵Concentrações; ⁶Não determinado.

A partir das Figuras 15 e 16 é possível confirmar que houve um consumo maior de carbono inorgânico quando comparado ao carbono orgânico, tanto no efluente composto 50B50S quanto no 75S25S, confirmando que há uma relação direta entre a atividade fotossintética e o crescimento do microrganismo, já que a luz foi utilizada como fonte de energia e carbono inorgânico como fonte de carbono.

O carbono inorgânico consumido pode estar na forma de CO₂, ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃⁻). A fonte mais usual das microalgas é o CO₂, pois o processo de difusão da água para o interior das células é um processo rápido, enquanto outras formas como o bicarbonato, é incorporado ativamente, gerando um gasto energético no processo (RAVEN, 1988). Quanto maior for o pH maior é a proporção de bicarbonato e carbonato no meio, enquanto em pH baixo as proporções CO₂ (livre) é aumentada (ESTEVEZ, 1988).

Em alguns momentos do cultivo é possível notar que houve um aumento de carbono inorgânico e assim aumento no carbono total, isso foi notado a partir do 14º dia, no qual as culturas já estavam em fase de declínio e morte celular, quando é liberado o conteúdo de dentro da célula para o meio.

Figura 15. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico para o efluente composto 50B50S

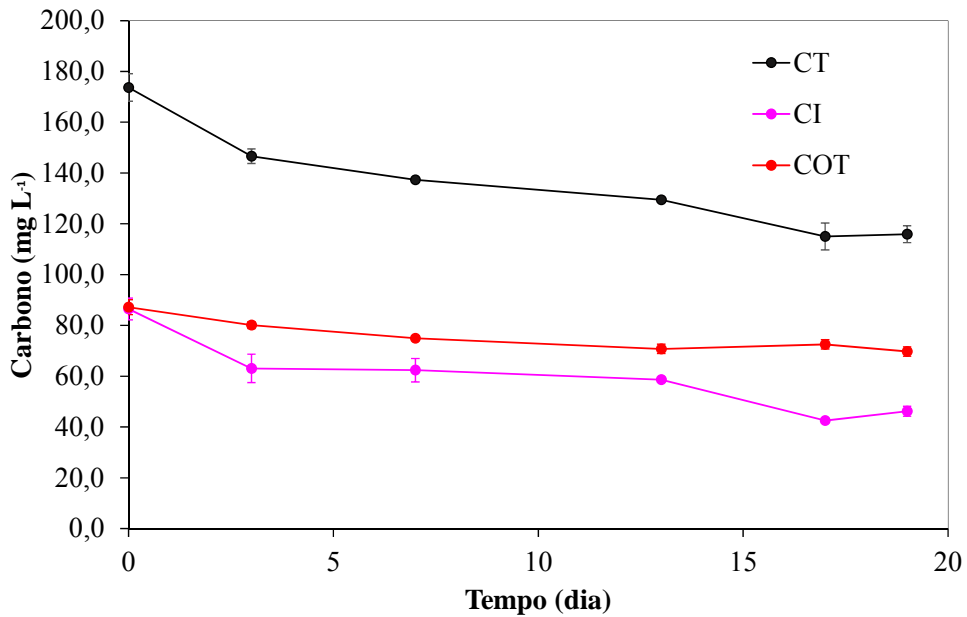
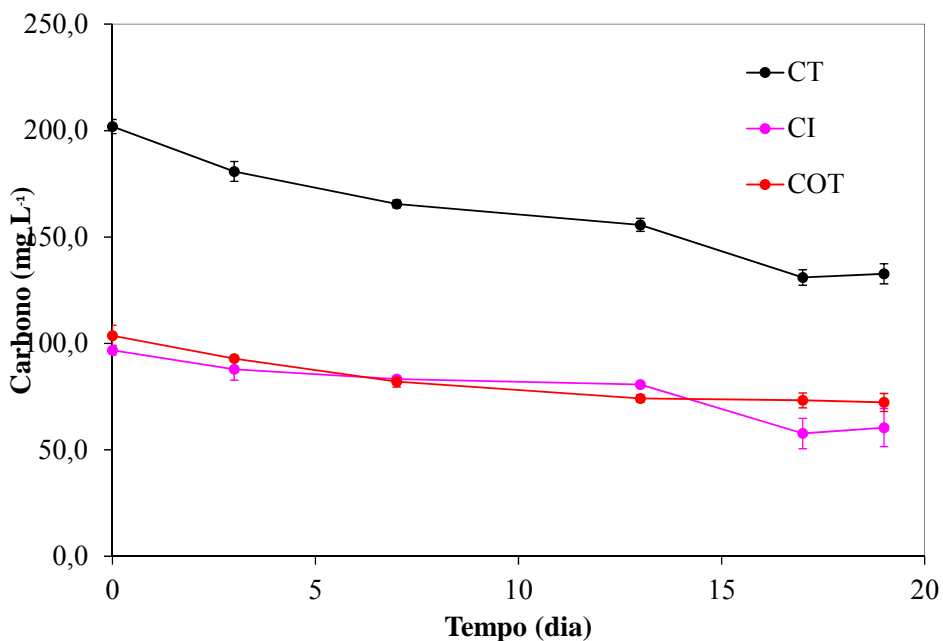


Figura 16. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico para o efluente composto 75B25S



Nas Figuras 17 e 18 são apresentadas as remoções de nitrogênio total e amônia,

respectivamente, ao longo dos 19 dias de cultivo fotoautotrófico do consórcio de microalgas.

A concentração inicial de amônia para 50B50S foi de $69,69 \text{ mg L}^{-1}$ e de nitrogênio $103,80 \text{ mg L}^{-1}$, tendo em vista que houve uma remoção total de amônia, calculou-se que apenas $4,57 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio em outras formas foram removidos uma vez que foi removido $74,25 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio. Valores próximos de nitrogênio em outras formas que não sejam a amônia (NH_3^+) foram removidos para o efluente 75B25S ($4,47 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 17. Remoção de Nitrogênio ao longo do cultivo fotoautotrófico

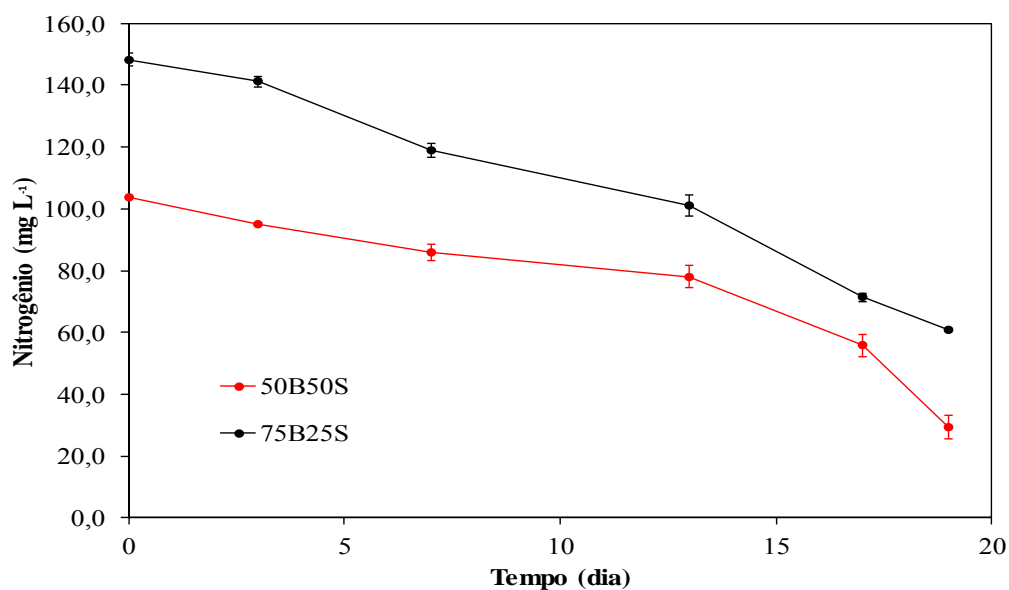
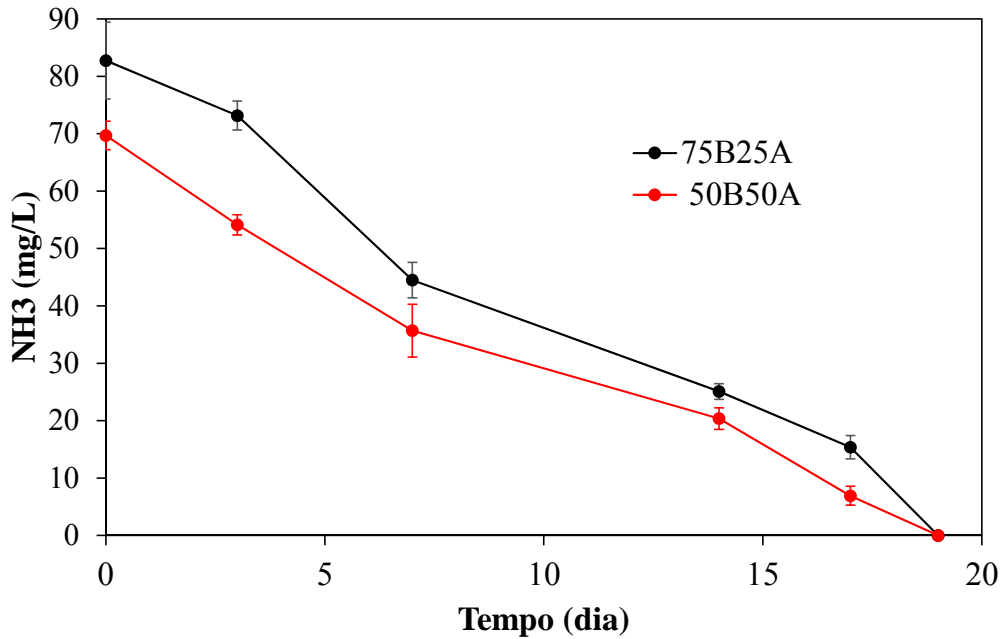


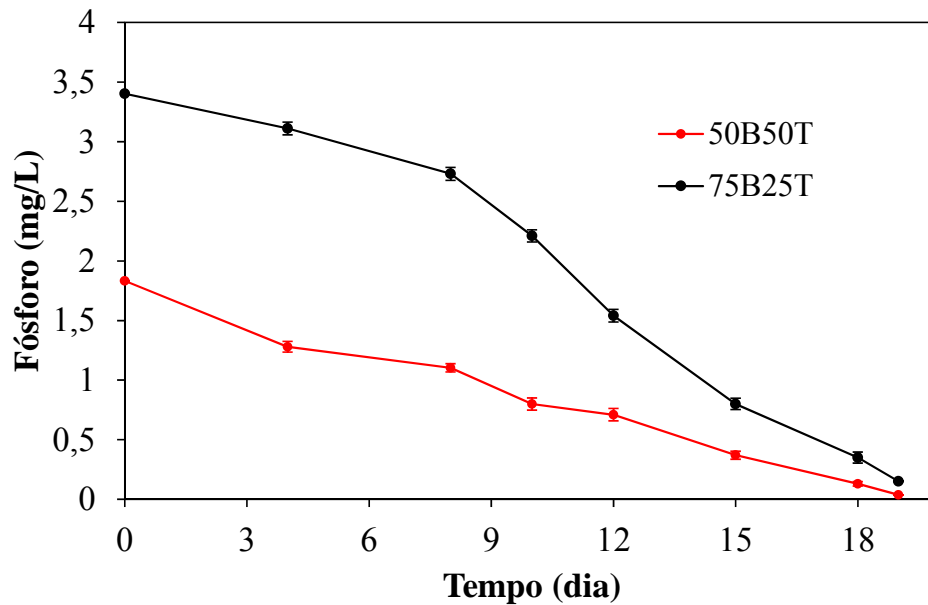
Figura 18. Remoção de Amônia ao longo do cultivo fotoautotrófico



A remoção do fósforo para o cultivo fotoautotrófico ao longo dos 19 dias de cultivo é apresentada na Figura 19.

Como as quantidades iniciais de fósforo são baixas e decaíram aos 19 dias de cultivos, este se torna um fator limitante do crescimento, uma vez que está ligado diretamente com algumas funções da célula.

Figura 19. Remoção de Fósforo ao longo do cultivo fotoautotrófico



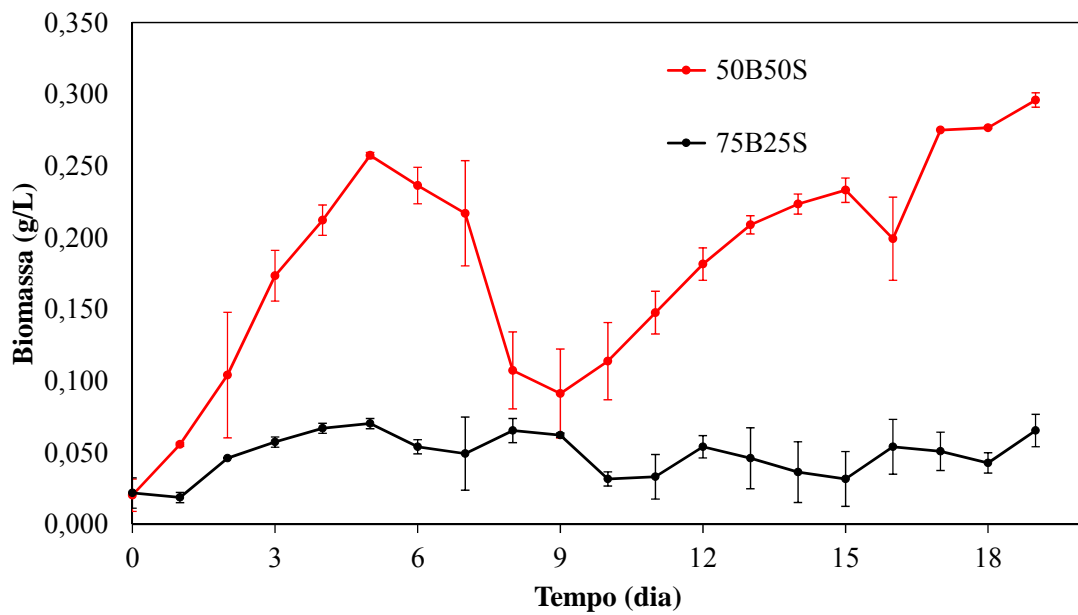
4.2.3 Cultivo Mixotrófico

No cultivo mixotrófico de microalgas ocorre a utilização simultânea de uma fonte luminosa e substrato orgânico como fonte de energia.

Desta forma, é necessário que ocorra um equilíbrio entre a luminosidade e a ausência de luz, pois sob baixa iluminação, a energia disponível é insuficiente, enquanto o contrário, ou seja, o excesso de luz, também causa a fotoinibição (YAN et al. 2011). A luz nos cultivos varia tanto no espaço (profundidade e latitude) quanto no tempo (diariamente e sazonalmente para cultivos abertos), tornando um fator condicionante do crescimento das microalgas (DARLEY, 1982). Isso explica o menor crescimento do consórcio, tanto em biomassa, quanto em taxa, no cultivo mixotrófico, quando comparado ao cultivo fotoautotrófico, uma vez que houve ausência de luz a cada 12 horas e se trata de um efluente escuro, o que dificulta a entrada de luz no meio de cultivo. A Figura 20 mostram a biomassa produzida no cultivo mixotrófico com o consórcio de microalga.

De acordo com os resultados é possível notar que o efluente composto 50B50S permitiu maior crescimento de microalgas, confirmando que quanto mais escuro, ou seja, mais concentrado for o efluente, menor a penetração de luz e assim menor o crescimento.

Figura 20. Crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo mixotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S



A Tabela 10 apresenta os valores iniciais e finais dos parâmetros analisados do cultivo mixotrófico.

Ao comparar os valores obtidos no cultivo mixotrófico com o cultivo fotoautotrófico através das Tabelas 9 e 10, é possível afirmar que o cultivo fotoautotrófico apresentou valores maiores de remoção para todos os parâmetros analisados.

Tabela 10. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25A antes e após o cultivo mixotrófico com a microalgas isolada.

Parâmetros	50B50S ²		75B25S ³	
	Conc ⁴ . [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁴ . [mg l ⁻¹]	Remoção %
pH	CI ³	7,60	7,81	
	CF ⁴	8,47	8,62	
P-PO₄	CI ³	1,74±0,01	2,65±0,06	24,22
	CF ⁴	0,95±0,01	2,01±0,03	
NT	CI ³	104,54±4,58	117,36±5,63	41,68
	CF ⁴	55,56±0,65	48,84±0,65	
N-NH₃	CI ³	71,25±0,41	77,21±5,02	56,36
	CF ⁴	21,26±2,14	33,69±3,23	
DQO	CI ³	685,0±7,07	1120,00±0,0	33,58
	CF ⁴	455,0±7,07	700,0±14,14	
TOC	CI ³	93,78±4,57	100,88±1,30	33,14
	CF ⁴	65,07±4,95	67,45±3,96	
DBO₅	CI ³	1090,0±28,28	1270±56,57	25,98
	CF ⁴	820,0±14,14	940,0±14,14	

¹50% Bruto diluído com 50% Secundário (50B50S); ²75% Bruto diluído com 25% Secundário (75B25S);

³Concentração inicial; ⁴ Concentração final, ⁵Concentrações.

As Figuras 21 e 22 apresentam a remoção de nitrogênio total e amônia ao longo do cultivo mixotrófico nas composições 50B50S e 75B25S.

Novamente é possível notar que baixos valores de nitrogênio (que não esteja na forma amônia) foram removidos (1,01 mg L⁻¹ e 5,4 mg L⁻¹) nos efluentes 50B50S e 75B25S, respectivamente.

Figura 21. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo mixotrófico

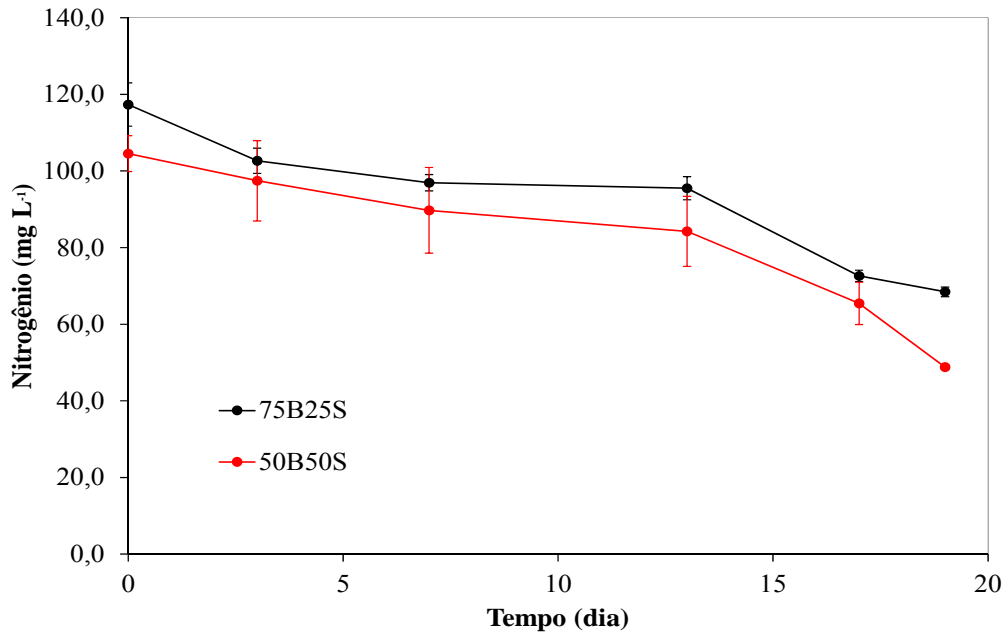
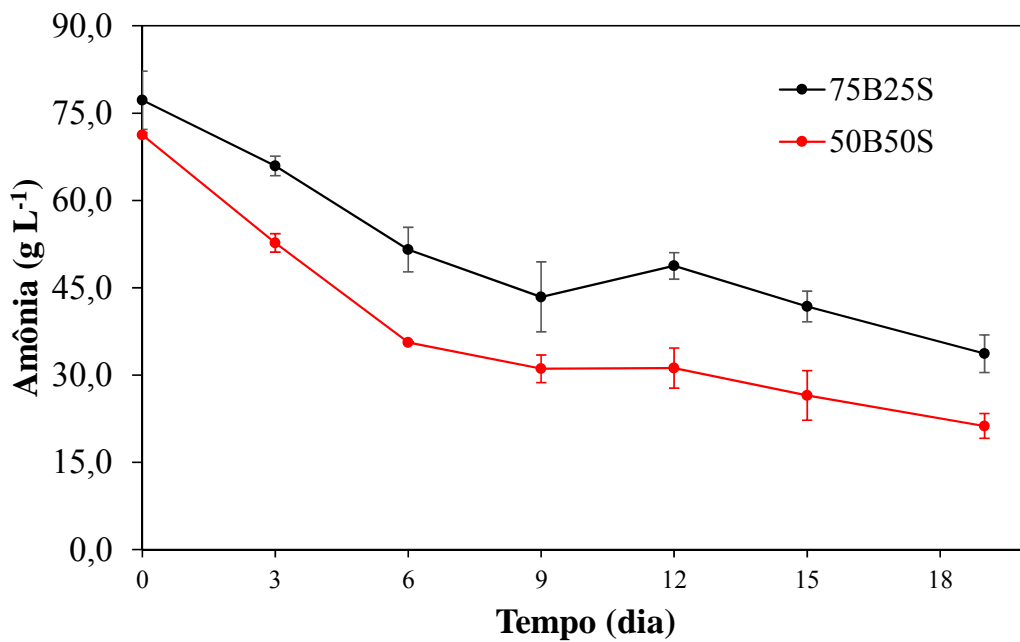
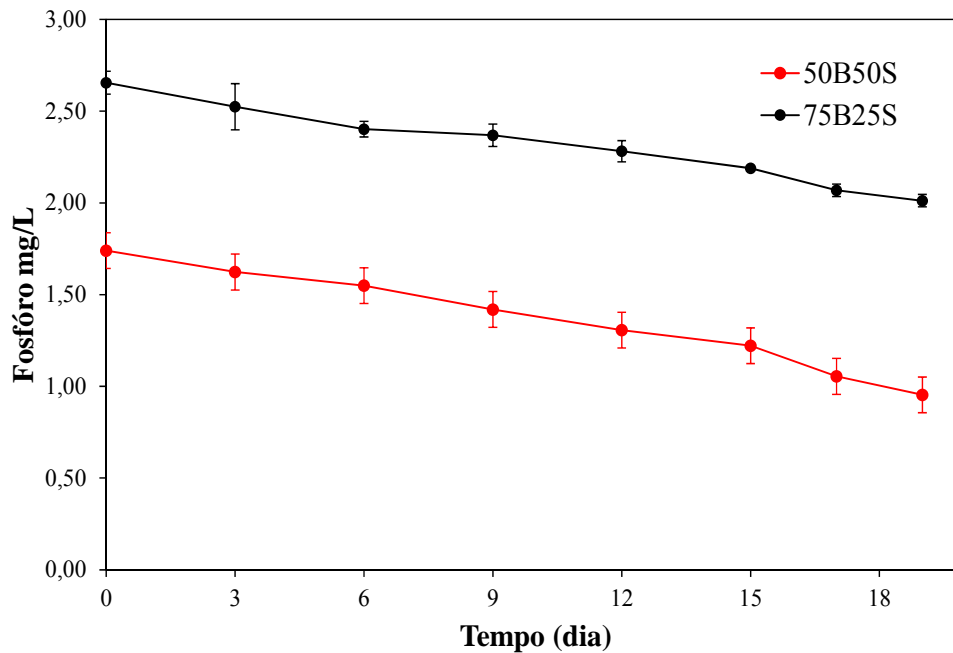


Figura 22. Remoção de Amônia ao longo do cultivo mixotrófico



Na Figura 23 é apresentada a remoção de fósforo ao longo do cultivo mixotrófico. É possível constatar que houve uma remoção menor de fósforo ao longo do cultivo mixotrófico para ambas as composições quando comparado ao cultivo fotoautotrófico.

Figura 23. Remoção de fósforo ao longo do cultivo mixotrófico



De acordo, com Radmann *et al.*, (2009) a fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa pelas microalgas, como estas não conseguiram capturar o carbono do meio houve um menor crescimento. As remoções de carbono orgânico total, carbono total e carbono inorgânico são apresentadas na Figura 24 para o efluente composto 50B50S e na Figura 25 para o efluente composto 75B25S. É possível verificar uma remoção de carbono orgânico nos primeiros dias do cultivo e após o 13º dia a remoção de carbono inorgânico nas duas composições 50B50S e 75B25SA. Isso demonstra que há alguma microalga no consórcio capaz de consumir o carbono orgânico, ou seja, é capaz de crescer em cultivo mixotrófico.

Figura 24. Remoção de Carbono ao longo do cultivo mixotrófico para o efluente composto 50B50S

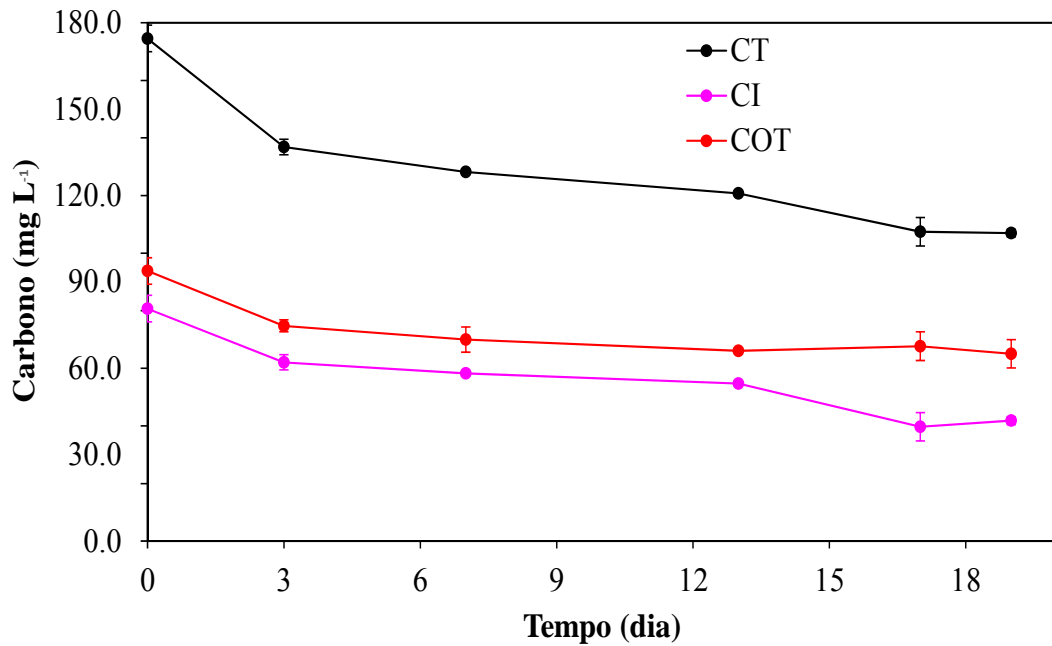
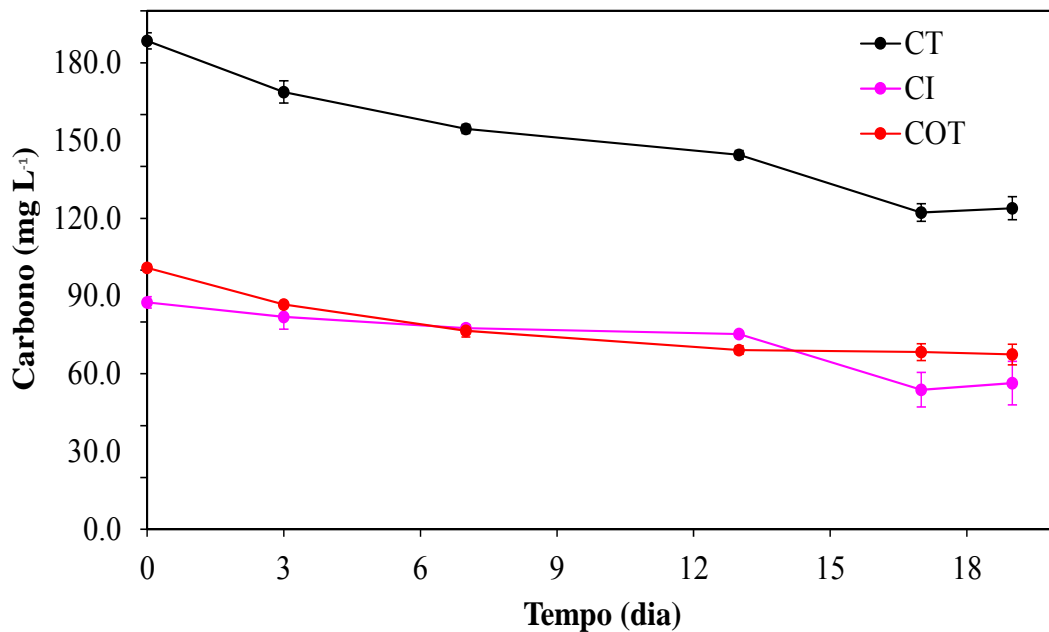


Figura 25. Remoção de Carbono ao longo do cultivo mixotrófico para o efluente composto 75B25S



4.2.4 Cultivo Heterotrófico

Algumas microalgas podem metabolizar compostos orgânicos no cultivo heterotrófico tais como lactose, acetato, glicose, glicerol, frutose e outros (LEE, 2004). No entanto, o cultivo heterotrófico não apresentou crescimento com o consórcio de microalgas

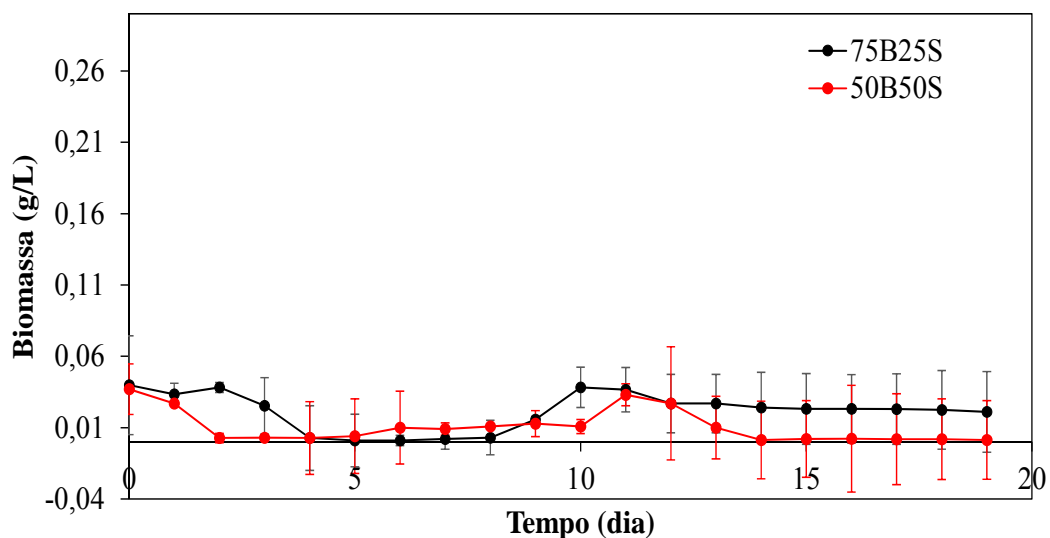
estudado, conforme apresentado na Figura 26 o gráfico de concentração de biomassa ao longo do cultivo.

A biomassa produzida pelo consórcio de microalgas em ambas as composições de efluente estudadas 50B50S e 75B25S, foi baixa quando comparado aos cultivos autotróficos e mixotrófico. O máximo crescimento do consórcio microalgal foi observado no efluente 75B25S, produzindo 0,038 g L⁻¹ de biomassa e no efluente 50B50S foi produzido 0,013 g L⁻¹.

Algumas espécies de microalgas são capazes de crescer no escuro usando fontes orgânicas de carbono. Várias espécies já estudadas apresentaram potencial para crescer tanto no cultivo fotoautotrófico quanto heterotrófico como a *Neochloris* (MORARES-SANCHEZ *et al.*, 2011), a *Tetraselmis* (AZMA *et al.*, 2011), algumas espécies de *Chlorella*, como *C. protothecoides* (SHI *et al.*, 1999), *C. vulgaris* (LIANG *et al.*, 2009)). Porém, o presente consórcio de microalgas não apresentou crescimento de biomassa no cultivo heterotrófico.

O crescimento do consórcio de microalgas na ausência de luz poderia ter sido favorecido se fontes de carbono orgânico que podem ser assimilados pelas microalgas como glicose, glicerol, acetato, frutose, lactose e outros, tivessem sido adicionas ao efluente.

Figura 26. Curva de crescimento do consórcio de microalgas durante 19 dias de cultivo heterotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S



A partir do cultivo do consórcio de microalgas e das médias dos valores iniciais e finais dos nutrientes e pH, após os 19 dias de tratamento no efluente composto 50B50S, foi possível calcular as remoções, que são apresentadas na Tabela 11. A partir dos resultados encontrados no cultivo heterotrófico é possível afirmar que os menores valores de remoção para todos os parâmetros foram obtidos nesta condição, quando comparados aos cultivos

fotoautotrófico e mixotrófico. Isso comprova os baixos resultados de crescimento obtidos para o cultivo heterotrófico.

Tabela 11. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25A antes e após o cultivo heterotrófico com o consórcio de microalgas.

Parâmetros		50B50S ¹		75B25S ²	
		Conc ⁵ . [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁵ . [mg l ⁻¹]	Remoção %
pH	CI ³	7,68		7,96	
	CF ⁴	8,68		8,78	
P-PO ₄	CI ³	1,50±0,10	27,71	3,66±0,17	29,51
	CF ⁴	1,08±0,06		2,58±0,02	
NT	CI ³	103,08±0,31	13,23	118,00±2,68	11,76
	CF ⁴	90,07±7,09		104,14±3,90	
N-NH ₃	CI ³	74,44±0,45	2,39	76,37±0,46	4,31
	CF ⁴	72,66±0,59		73,08±0,40	
DQO	CI ³	820,00±14,14	4,88	1110,00±14,14	16,21
	CF ⁴	780,00±0,00		930,00±14,14	
TOC	CI ³	124,34±2,95	38,63	172,14±0,87	38,17
	CF ⁴	76,3±1,82		106,42±5,52	
DBO	CI ³	1150,0±42,43	6,09	1340,0±0,00	16,42
	CF ⁴	1080,0±28,28		1320,0±28,28	

¹50% Bruto diluído com 50% Secundário (50B50S); ²75% Bruto diluído com 25% Secundário (75B25S);

³Concentração inicial; ⁴ Concentração final, ⁵Concentrações.

As Figuras 27, 28 e 29 apresentam as remoções de nitrogênio total, amônia e fósforo ao longo do cultivo heterotrófico nas composições 50B50S e 75B25S.

A remoção de amônia nas composições de 50B50S e 75B25S foram baixas, (2,39 e 4,31%, respectivamente), assim como de nitrogênio, comprovando o baixo crescimento das microalgas uma vez que o nitrogênio é um elemento essencial para o metabolismo primário das microalgas.

Figura 27. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo heterotrófico

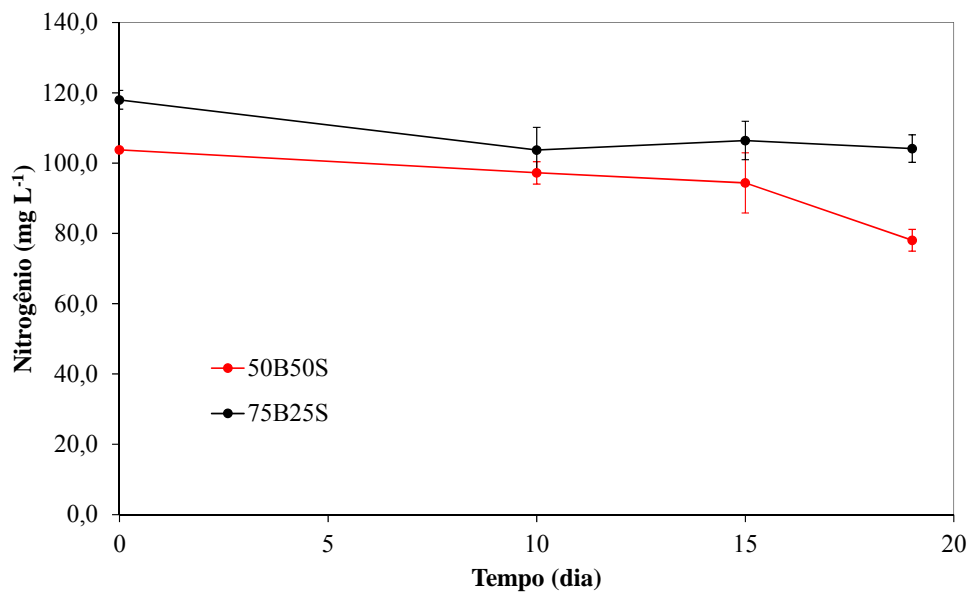
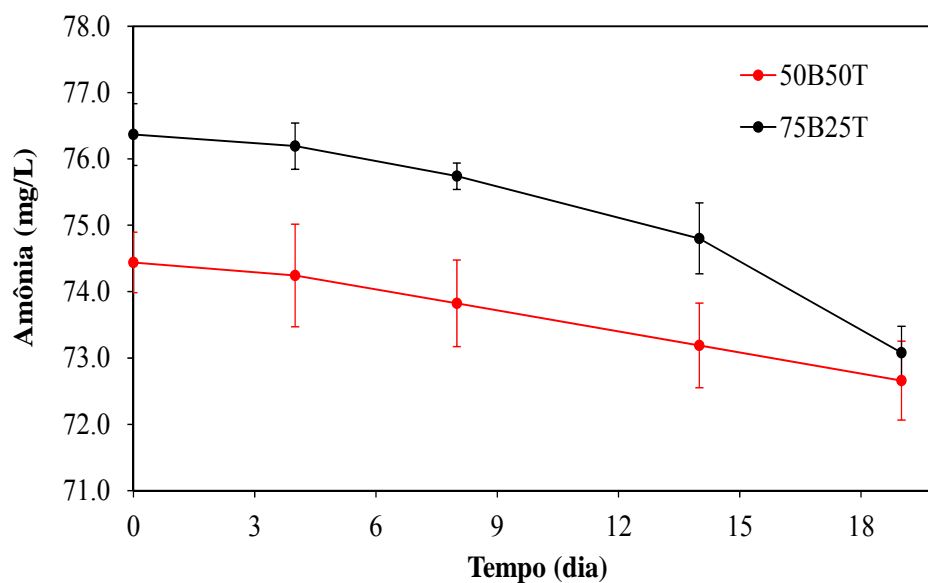
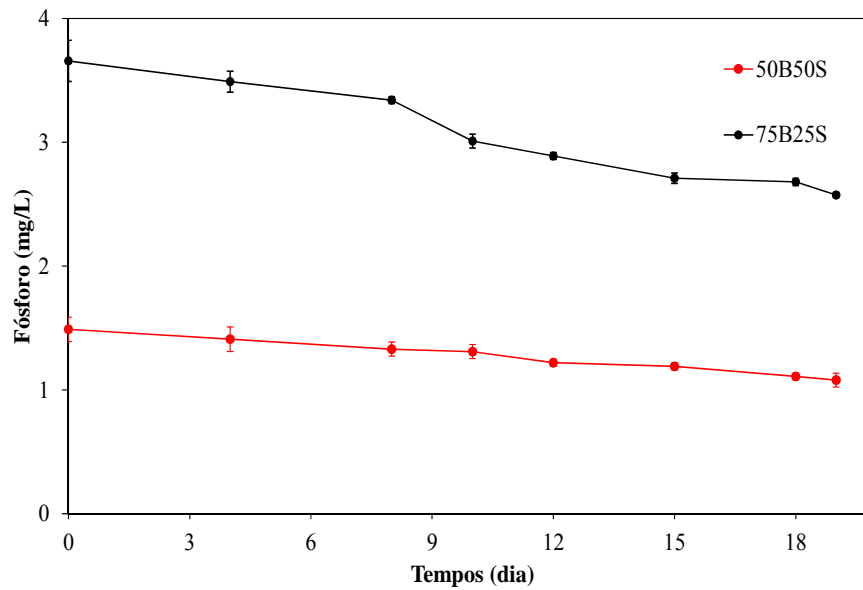


Figura 28. Remoção de amônia ao longo do cultivo heterotrófico



Houve uma pequena absorção de fósforo no cultivo heterotrófico, isso pode ser explicado pelo fato da assimilação de fósforo ser dependente de luz (LOURENÇO, 2006).

Figura 29. Remoção de fósforo ao longo do cultivo heterotrófico



O contrário pode ser observado para os compostos orgânicos que foram utilizados como fontes de carbono e energia para seu crescimento, uma vez que houve consumo maior de carbono orgânico que de carbono inorgânico, como pode ser visto nas Figuras 30 e 31. É possível notar que houve uma remoção maior de carbono orgânico no efluente composto 50B50S, quando comparado ao 75B25S.

Houve pequenas remoções de carbono orgânico, demonstrando que as quantidades presentes no efluente na forma que as microalgas catabolizam por exemplo, glicose ou acetato podem ter sido insuficientes (LOWREY *et al.*, 2015)

Figura 30. Remoção de Carbono ao longo do cultivo heterotrófico na composição de 50B50S

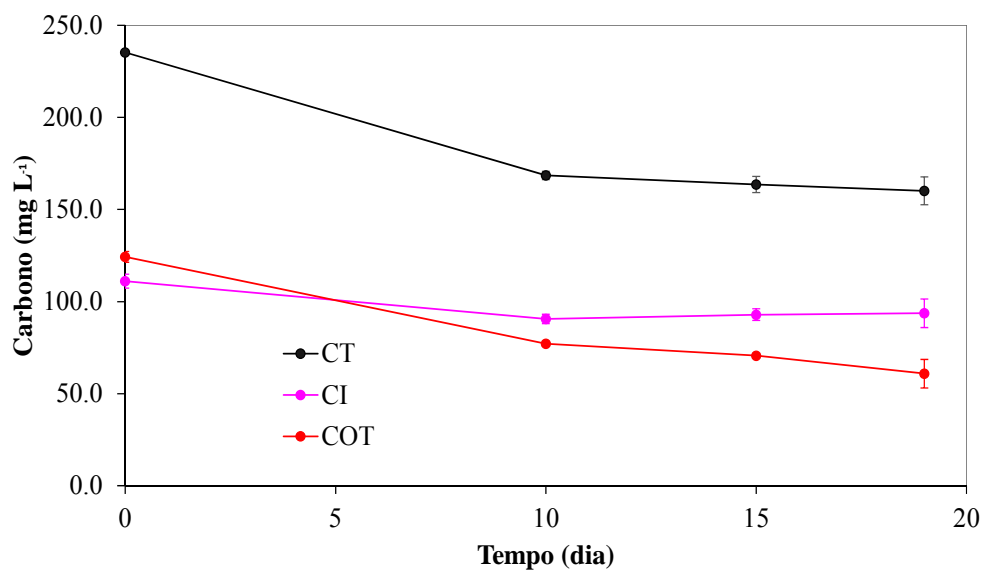
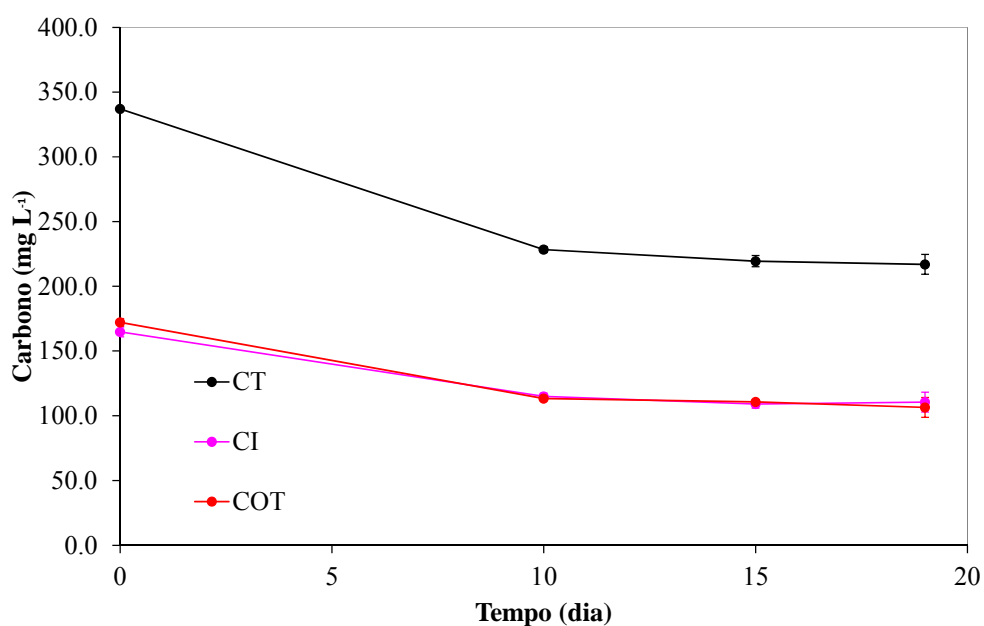


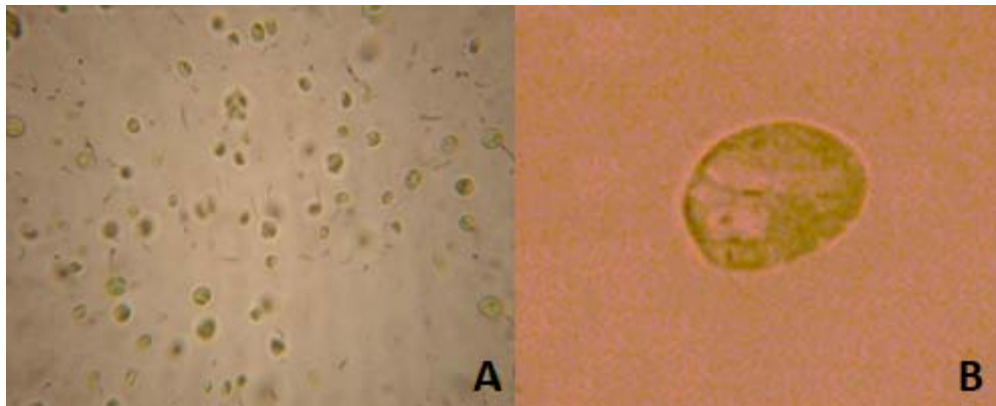
Figura 31. Remoção de Carbono ao longo do cultivo heterotrófico na composição de 75B25S



4.3 Isolamento e identificação

A técnica de plaqueamento com sucessivas diluições mostraram-se eficientes para o isolamento do microrganismo predominante. A Figura 32 mostra uma imagem microscópica do consórcio de microalgas e da microalga predominante isolada.

Figura 32. Consórcio de microalgas (aumento de 10x); B) Microalga isolada (aumento microscópico de 40x)



O organismo isolado apresentou as seguintes características: unicelular, verde, com flagelos de mesmo tamanho, monadal, forma ovóide, com dois flagelos e movimentação rápida.

De acordo com Menezes e Bicudo (2008), as células de *Tetraselmis* tem de 20 a 24 μm de comprimento, 12-16 μm de largura, são achatadas, amplamente elípticas na vista frontal, em forma de rim em vista lateral, arredondada. *Tetraselmis* são células com capacidade de se comprimir com quatro flagelos que estão localizados em pares opostos. Os flagelos são espessos, de comprimento igual, menores do que o comprimento da célula, cobertos por cabelos.

Desta forma, a microalga apresentou semelhança com a microalgas *Tetraselmis sp.*, pelo formato citado anteriormente e pela presença de flagelos, além de suas características como facilidade de adaptação em diversos meios e na facilidade de locomoção (KLEIN; GONZALEZ, 1993).

4.3.1 Cultivo fotoautotrófico com a microalga isolada

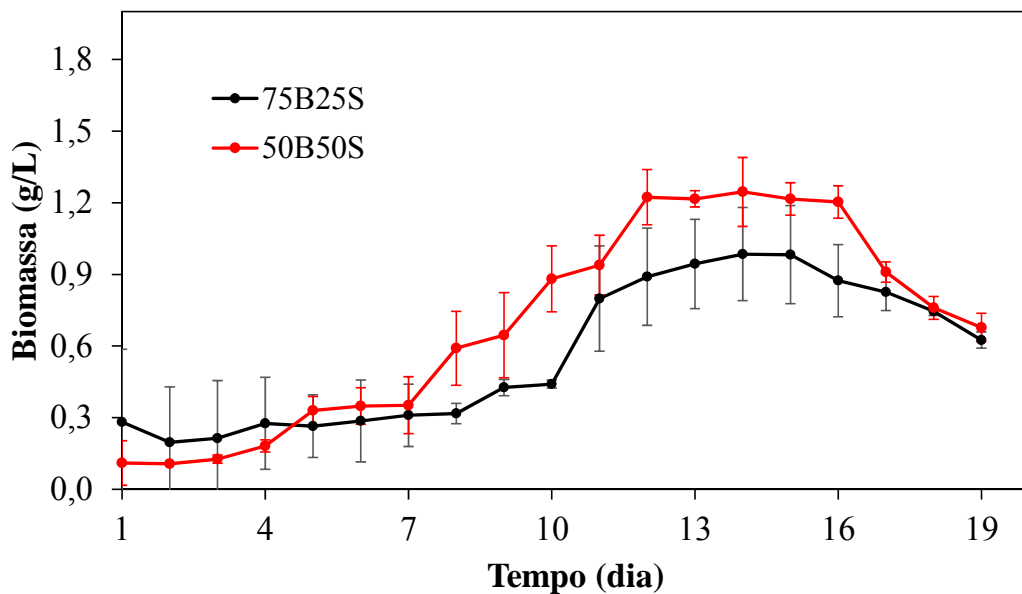
A Figura 33 apresenta a biomassa no cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.* para as composições 50B50S e 75B25S e apresenta a curva de crescimento microalgal nestes cultivos.

A microalga isolada apresentou valores próximos de crescimento nos efluentes em condição fotoautotrófica, quando comparado ao crescimento do consórcio de microalga, uma vez que a concentração máxima atingida foi de $1,24 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ (50B50S) para a *Tetraselmis sp.* e $1,40 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$ (75B25S) para o consórcio. Isto comprova que existe uma contribuição expressiva da microalga isolada no consórcio.

Ademais a biomassa produzida foi menor para o efluente composto 75B25S, quando comparado ao 50B50S com a *Tetraselmis sp.* demonstrando que houve um stress maior

causado pela concentração maior de efluente bruto. Isto revela-se contrário ao que foi observado para o consórcio de microalga no cultivo fotoautotrófico, pois houve melhor crescimento e remoções do consórcio para o efluente 75B25S, demonstrando que o consórcio foi mais resistente a concentrações maiores do efluente bruto, isso pode ser justificado pela presença de outras microalgas existentes no consórcio.

Figura 33. Crescimento da microalga *Tetraselmis sp.* durante 19 dias de cultivo fotoautotrófico em efluentes compostos 50B50S e 75B25S.



A Tabela 12 apresenta as médias iniciais, finais e as remoções do cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.* e o pH inicial e final.

Fontoura *et al.* (2017a) encontraram valores máximos de remoção de nitrogênio amoniacal (85,63%), fósforo (96,78%) e DQO (80,33%) para a microalga *Scenedesmus sp.* em águas residuais de curtumes da etapa de ribeira, diluídas (88,4%) e em intensidade de luminosa de $182,5 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores encontrados pelos referidos autores mostram-se próximos aos valores de remoção aqui encontrados (Tabela 12): para fósforo (96,59% e 99,81%) e nitrogênio amoniacal (99,90% e 85,63%), porém as remoções de DQO foram menores (40,46% e 43,54%).

Tabela 12. Parâmetros médios dos efluentes compostos 50B50S e 75B25S antes e após o cultivo fotoautotrófico com o a microalgas *Tetraselmis sp.*.

Parâmetros		50B50S ¹		75B25S ²	
		Conc ⁵ . [mg l ⁻¹]	Remoção %	Conc ⁵ . [mg l ⁻¹]	Remoção %
pH	CI ³	7,45		7,68	
	CF ⁴	8,58		8,75	
P-PO ₄	CI ³	1,75±0,02	96,59	2,25±0,04	99,81
	CF ⁴	0,01±0,00		0,06±0,01	
NT	CI ³	83,13±2,25	89,06	89,91±3,09	54,78
	CF ⁴	9,09±0,139		40,92±1,64	
N-NH ₃	CI ³	73,90±3.31	99,90	79,30±2,00	89,212
	CF ⁴	N.D. ⁶		8,55±0,35	
DQO	CI ³	991,00±12,73	40,46	1045,0±7,07	43,54
	CF ⁴	590,00±14,14		590,00±14,14	
TOC	CI ³	115,52±4,84	59,24	126,31±2,16	57,90
	CF ⁴	47,57±0,21		53,18±5,37	
DBO	CI ³	1590,0±14,14	32,70	1900,0±28,28	44,73
	CF ⁴	1070,0±14,14		1050,0±14,14	

¹50% Bruto diluído com 50% Secundário (50B50S); ²75% Bruto diluído com 25% Secundário (75B25S);

³Concentração inicial; ⁴ Concentração final, ⁵Concentrações e ⁶Não determinado.

Nas Figuras 34 e 35 são apresentadas as remoções de nitrogênio total e amônia ao longo dos 19 dias de cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.*, respectivamente. Nos últimos dias de cultivo houve um aumento de nitrogênio total no meio, concomitante com a fase de declínio das microalgas, ao morrerem as células se rompem liberando nutrientes para o meio. É possível notar que houve um aumento de amônia no 7º dia de cultivo tanto para a concentração de 50B50S, quanto para a concentração de 75B25S. Isso pode ser explicado pelo aumento de pH, pois quanto mais elevado for o pH, maior será a porcentagem da amônia total presente na forma NH₃⁺ e é a forma detectada pelo equipamento.

Figura 34. Remoção de Nitrogênio total ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.*

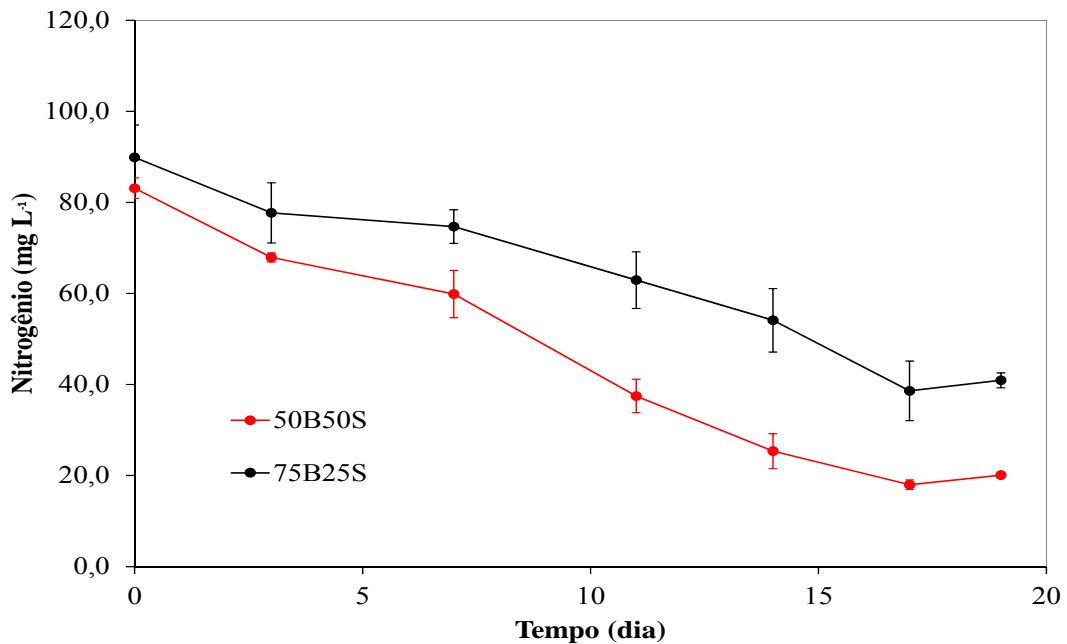
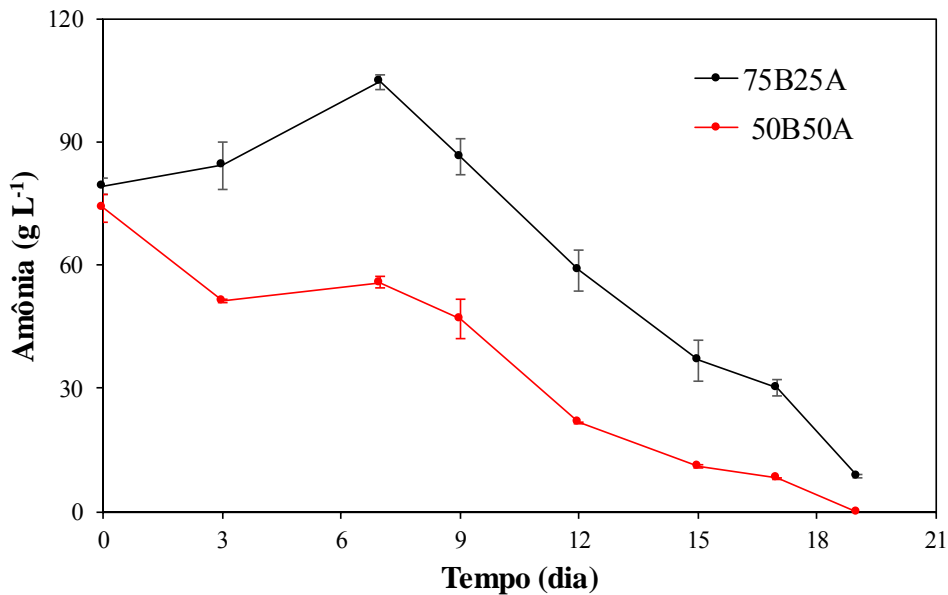


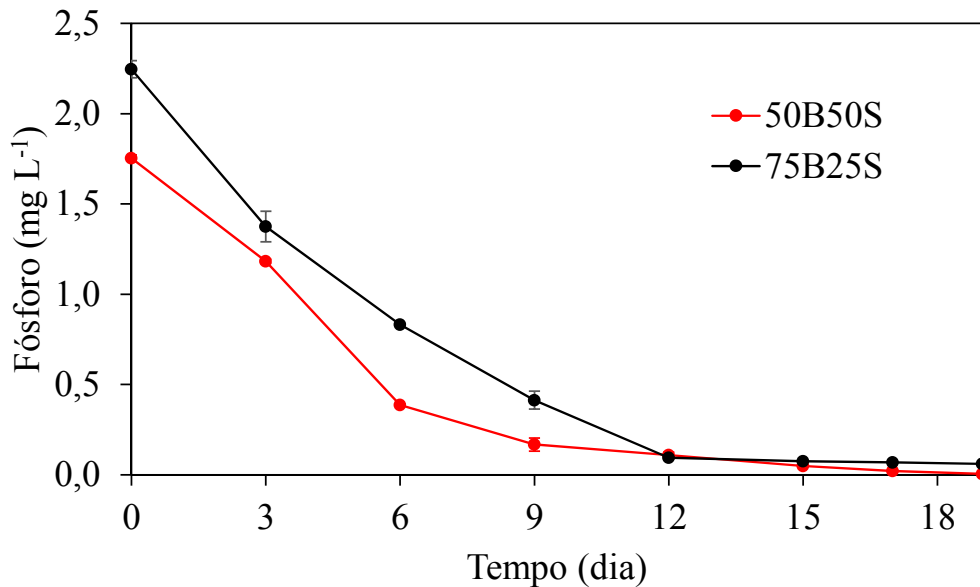
Figura 35. Remoção de Amônia ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.*



Resultados apresentados por Rose e Dunn (2013) aplicando a microalga *Arthrospira (Spirulina)* na produção de biomassa e no tratamento de efluente de curtume, mostraram concentração celular máxima de 0,78 g/L com 38,2% de remoção de nitrogênio amoniacal e 91% de remoção de fósforo.

A Figura 36 mostra a remoção de fósforo obtida ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.* para as composições 50B50S e 75B25S. As remoções de fósforo foram efetivas para este experimento chegando as remoções de 96,59% e 99,81% para as composições 50B50S e 75B25S, respectivamente.

Figura 36. Remoção de Fósforo ao longo do cultivo fotoautotrófico com a microalga *Tetraselmis sp.*



Nas Figuras 37 e 38 são apresentadas as remoções de carbono pela da microalga *Tetraselmis sp.* nos cultivos fotoautotróficos. É possível notar que houve tanto uma remoção de carbono orgânico como carbono inorgânico nos cultivos 50B50S e 75B25S. Isso pode ser explicado pela dificuldade da penetração da luz no efluente por ser escuro, promovendo a utilização de carbono orgânico como fonte de energia em algum momento pela microalga *Tetraselmis sp.*

Figura 37. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico 50B50S com a microalga *Tetraselmis sp.*

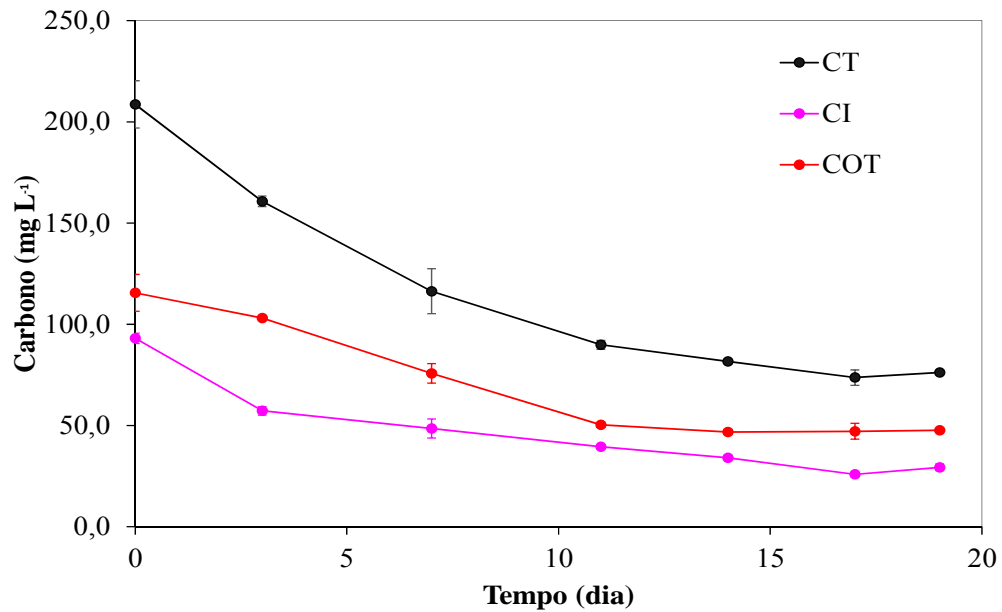
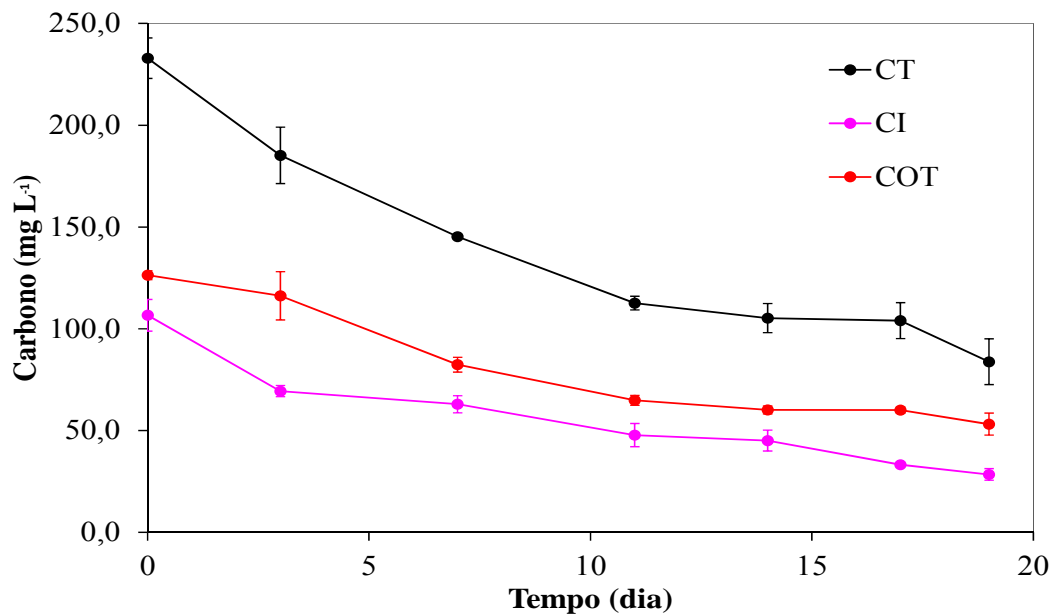


Figura 38. Remoção de Carbono ao longo do cultivo fotoautotrófico 75B25S com a microalga *Tetraselmis sp.*



4.3.2 Quantificação de lipídios

As microalgas do gênero *Tetraselmis* têm conteúdos moderados de ácidos graxos poli-insaturados, (Brown *et al.*, 2002). A composição química das microalgas pode ser influenciada pela forma de cultivo e pela composição do meio, podendo atingir taxas de crescimento elevadas e alta produtividade de biomassa, com frações elevadas de proteína,

lipídios ou carboidratos. Os componentes de armazenamento ou reservas de energia de microalgas são principalmente polissacarídeos (Mata *et al.*, 2010).

O lipídio é um dos componentes mais desejados do ponto de vista energético. Os principais ácidos graxos encontrados na biomassa da microalga *T. suecica* são o ácido palmítico e o ácido oleico (GO *et al.*, 2012).

A Tabela 13 mostra a quantidade de lipídio na biomassa após o cultivo fotoautotrófico em determinações feitas em triplicatas com réplicas dos experimentos com os efluentes compostos 50B50S e 75B25S. As quantidades de lipídios encontradas na biomassa da microalga *Tetraselmis sp.* foram relativamente baixas quando comparadas a outras microalgas: 31 a 68% para a microalga *Nannochloropsis oculata*, 28 a 32% para *Chlorella sp.*, 16 a 37% para *Cylindrotheca sp.*, 15 a 23% para *Tetraselmis suecica*, quando cultivadas em sistema fotoautotrófico (CHISTI, 2007), e 23,62% de lipídios na biomassa de um consórcio microalgas em efluente de uma fazenda leiteira (HENA *et al.* 2015).

Tabela 13. Quantificação de lipídios na biomassa da microalga *Tetraselmis sp.* em cultivo fotoautotrófico ao final do cultivo

	50B50S (%)	75B25S (%)
1	4,08 ± 0,02	5,20 ± 0,16
2	5,10 ± 0,29	4,88 ± 0,01

Rodolfi *et al.* (2009) estudaram algumas espécies de *Tetraselmis* em cultivo fotoautotrófico e obtiveram 14,7% de lipídios para *Tetraselmis sp.* e 8,5% para *Tetraselmis suecica* F&M-M33.

Altas concentrações de lipídios nas células são obtidas sob condições de stress, associadas com divisão celular reduzida, devido a isso é importante obter um equilíbrio entre a produção de biomassa e a quantidade de lipídios na célula, encontrando um ponto ótimo da concentração de nitrogênio no meio, uma vez que as quantidades de lipídios encontradas na biomassa e o crescimento variam com as concentrações de nitrogênio total (WANG *et al.*, 2008)

De acordo com Becker (2007), as microalgas marinhas *Tetraselmis maculate* tem aproximadamente 52% de proteínas e 15% de carboidratos na composição celular. As microalgas *Tetraselmis sp.* são amplamente utilizadas na aquicultura, uma vez que servem de alimento para uma grande variedade de organismos marinhos exatamente por não apresentarem altos valores de lipídios na biomassa (GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Capítulo 5

CONCLUSÃO

O consórcio de microalgas apresentou desempenho de crescimento no efluente gerado no acabamento de couro, tanto para o efluente sem tratamento prévio (50B50A), quanto para efluente após o tratamento primário (50P50A) e secundário (50S50A) e sem a necessidade de adição de nutrientes. O crescimento do consórcio e a remoção dos parâmetros analisados se mostraram próximos entre estes efluentes testados.

Ao comparar o efluente bruto 100B com efluentes compostos nas composições 25B75S, 50B50S, percebeu-se que o melhor crescimento de microalgas foi atingido em efluentes 50B50S, sendo mais eficiente na remoção de nitrogênio, amônia nitrogenada, DQO, TOC e fósforo.

Quando colocado em cultivo fotoautotrófico, mixotrófico e heterotrófico o consórcio de microalgas obteve melhores resultados tanto de crescimento quanto de remoção dos parâmetros no cultivo fotoautotrófico na concentração de 75B25S, crescendo até $1,4 \text{ g L}^{-1}$ e atingindo valores de remoção de N-NH_3 , Nitrogênio Total (NT), DQO, carbono orgânico total (TOC) e demanda biológica de oxigênio (DBO), de 99,90%, 74,89%, 56,70%, 58,18% e 20,68%, respectivamente.

A técnica de plaqueamento e as diluições sucessivas mostraram-se eficientes para o isolamento do microrganismo predominante. Através da identificação por imagem foi possível concluir que a microalga isolada foi a *Tetraselmis sp.*

A microalga isolada (*Tetraselmis sp.*) foi capaz de crescer no efluente de curtume sem tratamento prévio nas composições 50B50S e 75B25S, apresentando um crescimento notório no cultivo fotoautotrófico com remoções eficientes dos parâmetros analisados, de 99,9% 89,06% e 59,24% para N-NH₃, NT e TOC, respectivamente, no efluente 50B50S e de 99,81%, 43,54% e 44,73 para P-PO₄, DQO e DBO, respectivamente para o efluente 75B25S. Entretanto os valores de lipídios na biomassa desta microalga foram baixos (aproximadamente 5,0% de lipídio no peso seco).

Os valores de crescimento e remoção dos parâmetros analisados quando comparados no cultivo fotoautotrófico para a microalga *Tetraselmis sp.* e o consórcio de microalgas, mostram que o consórcio de microalgas apresenta valores de crescimento de biomassa de 1,2 g L⁻¹ para a microalga *Tetraselmis sp.* (50B50S) e 1,4 g L⁻¹ para o consórcio (75B25S), demonstrando que o consórcio de microalgas se mostrou mais eficiente no tratamento de efluente de curtume quando comparado a microalga predominante isolada.

Desta forma, o uso do consórcio de microalgas é uma forma promissora para tratamento de efluentes para a remoção de fósforo, amônia, nitrogênio, DQO, DBO, carbono, uma vez que não são utilizados produtos químicos no tratamento e a biomassa tem potencial para várias aplicações posteriormente.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados promissores atingidos neste trabalho mostram que existem diversos caminhos a serem estudados nesta pesquisa como:

- Realizar a identificação a nível molecular da microalga *Tetraselmis sp.*;
- Identificar as demais espécies de microalgas presentes no consórcio;
- Analisar a remoção de metais tóxicos pelas microalgas;
- Realizar um planejamento experimental para otimizar o tratamento de efluente com o consórcio de microalgas;
- Realização de um processo contínuo em escala piloto, com suprimento de efluente para o crescimento das microalgas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**. 1-20. Rio de Janeiro, Projeto NBR 12648:2004. 28ª reunião.

ABQTIC. Guia brasileiro do couro. 2017.

AGUSTINI, C. B.; HAUBERT, G.; BARCELLOS, B. S. C. GUTTERRES, M. Mass Reduction of Tannery Solid Wastes by Biodegradation. **JSLTC**, 100: 271-273, 2014.

AJAV E, SINGH B, BHATTACHARYA T. Experimental study of some performance parameters of a constant speed stationary diesel engine using ethanol–diesel blends as fuel. **Biomass-Bioenergy**; 357–65, 1999.

AJAYAN, K. V. *et al.* Phycoremediation of Tannery Wastewater Using Microalgae *Scenedesmus* Species. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, n. 10, p. 907–916, 3 out. 2015.

ANGELIS, S.; *et al.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 167 (5), 1092–1106, 2012.

ANDERSEN, R. Algal Culturing Technique. San Diego: **Elsevier**. 2005.

AQUIM P. M. **Gestão em curtumes: Uso integrado e eficiente da água**. Porto Alegre, 2006.

ARAÚJO, W. E. L.; PASQUALETTO, A. **Utilização de Algas no Tratamento de Efluente Doméstico**. Goiânia, GO. 2005.

ARCEO, Á. A. Produção de biodiesel mediante o processo de Hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata*. **Tese** (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

AZMA, M., MOHAMED, M. S., MOHAMAD, R., RAHIM, R. A., ARIFF, A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochem. Eng. J.** 53, 187–195. 2011.

BAKER, A. L. Phycokey an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology, 2012.

BAUDELET P., RICOCHON G., LINDER M., MUNIGLIA L. A new insight into cell walls of Chlorophyta. **Algal Research**, v. 25, p. 333-371, 2017.

BECKER, E. W. Oil production. In: Baddiley, et al., editors Microalgae: biotechnology and microbiology. **Cambridge University Press**; 1994.

BECKER, E. W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology Advanced**, p. 207-210 2007.

BEHRENS, P. W. Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae, in: Andersen, R.A. (Ed.), **Algal Culturing Techniques**. Elsevier Academic Press, 2005.

BENVENUTI, J. Sílicas híbridas com impressão molecular para adsorção de compostos de taninos. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

BERTOLDI, C. F.; BENVENUTI, J., FORTINO, P. C.; GUTTERRES, M. Métodos analíticos para determinação de compostos em efluentes de curtume. 10º Simpósio internacional de qualidade ambiental, 2016.

BHARAGAVA, R. N. & MISHRA S. Hexavalent chromium reduction potential of Cellulosimicrobium sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industrie. **Ecotoxicology and Environmental Safety journal**, 147:102–109, 2018.

BLIGH, E. G. AND DYER, W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37: 911-917, 1959.

BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de Aphanotece microscopica Nägelli e Chlorella vulgaris em diferentes fontes de carbono em vinhaça. **Dissertação de Mestrado**, UFSCar, Araras, 2012.

CAMPOS, B. V.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2: 309–317, 2010.

BOROWITZKA M. A., MOHEIMANI N. R. Algae for Biofuels and Energy, 5. Springer; 2013.

BRÄCHER, G. H. Avaliação do potencial de aplicação de *Aphanothece microscopica* Nägeli no tratamento de efluente de curtume. **71f. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária.** Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

BRACHER A.; TAYLOR M. H.; TAYLOR B.; DINTER T.; RÖTTGERS, R.; STEINMETZ F. Using empirical orthogonal functions derived from remote-sensing reflectance for the prediction of phytoplankton pigment concentrations. **Ocean Science**, 11:139-158, 2015.

BROWN L. M. ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, p. 1005-13, 1993.

BUNTHAWIN, S.; RITCHIE, R. J.; WANICHAPICHART, P. Dielectrophoresis of *Tetraselmis* sp., a unicellular green alga, in travelling electric fields analyzed using the RC model for a spheroid. **Journal of Science and Technology**, 33 (5): 585-597, 2011.

CARDOSO A. S.; VIEIRA, G. E. G; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Brazilian Journal of Biosciences.** Porto Alegre, v. 9: 542-549, 2011.

CHAGAS, B. M., FILHO, O. C., PICARDO, M. C., ARAÚJO, O. Q., da SILVA, A. F., CHALOUB, R. M. Otimização da Produção de Lipídios pela Microalga Marinha *Isochysis galbana* sob condições de estresse nutricional. COBEQ - XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, p. 1733-1741, 2010.

CHAN, A.; SALSALI, H.; MCBEAN, Ed. Nutrient removal (nitrogen and phosphorous) in secondary effluent from a wastewater treatment plant by microalgae. **Canadian Journal of Civil Engineering**, 2013.

CHAMBERS, P. A.; MCGOLDRICK, D. J.; BRUA, R. B.; VIS, C.; CULP, J. M.; BENOY, G. A. Development of environmental thresholds for nitrogen and phosphorus in streams **Journal of Environmental. Quality**, 41: 7-20, 2012.

CHEN C.; YEH K.; AISYAH R.; LEE D CHANG J. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, 102 (1): 71-81, 2011.

CHEN, C.Y., YEH, K.L., AISYAH, R., LEE, D.J. & CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, 102: 71-81, 2011.

CHINNASAMY, S., BHATNAGAR, A., HUNT, R.W., DAS, K. C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology journal**, 101(9): 3097–3105, 2010.

CHISTI Y., Biodiesel from microalgae, **Biotechnology. Advances**. 25: 294–306, 2007.

CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y.-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, 102(18): 8639–45. 2011.

CONAMA, Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução N°. 357. Available in: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>.

CONSEMA, Conselho Estadual Do Meio Ambiente. Resolução N°. 355. Available in: http://www.laboratoriogreenlab.com.br/images/pdf_gerais/Consema_355-2017.pdf, 2017.

COOPER, M., GUTTERRES, M., MARCÍLIO, N. R. Environmental developments and Researches in Brazilian leather Sector. **JSLTC** 95: 243-249, 2011.

CUNHA, A. M. Relatório de Acompanhamento Setorial: Indústria de Couro. **Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial – ABDI**. 2016.

DARLEY, W. M. Algal Biology: a physical approach. **Basic Microbiology**. 9:30-52, 1982.

DEMIRBAS A, DEMIRBAS M. FATIH. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manag*; 163–70, 2011.

DERNER, R. B.; *et al.* **Ciência Rural**. 36: 1959–1967, 2006.

DI LACONI, C.; LOPEZ A.; RAMDORI, R.; DI PINTO, A. C.; PASSINO R. Combined chemical and biological degradation of tannery wastewater by a periodic submerged filter. **Water Research**, 36(9): 205-214, 2001.

Referências Bibliográficas

-
- DUARTE, D. R. S. Alimentos funcionais com microalgas: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Humana e Animal), Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.
- DURAI, G.; RAJASIMMAN, M. Biological treatment of tannery wastewater - A review. **Journal of Environmental Science and Technology**, 4 (1):1–17, 2011.
- ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência – FINEP, p:575. 1988.
- FONTOURA, T. J.; ROLIM G S, FARENZENA M, GUTTERRES M. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. **Process Safety and Environmental Protection**, 1(2):355–62, 2017a.
- FONTOURA, T. J.; ROLIM G S, MELLA, B.; FARENZENA M, GUTTERRES M. Defatted microalgal biomass as biosorbent for the removal of Acid Blue 161 dye from tannery effluent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 5(5):5076–5084, 2017b.
- GANESH R., BALAJI G., RAMANUJAM R.A., Biodegradation of tannery wastewater using sequencing batch reactor respirometric assessment. **Bioresource Technology**, 97: 1815–1821, 2006.
- GO, S.; LEE, S.; JEONG, G.; KIM, S. Factors affecting the growth and the oil accumulation of marine microalgae, *Tetraselmis suecica*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 35:145 - 150, 2012.
- GONZÁLEZ, M. A; PARRA, O. O.; CIFUENTES, A. S. Manual de Métodos Ficológicos. 219-250, 1995.
- GONZÁLEZ, M. *et al.* Ultrastructural and molecular characterization of *Tetraselmis* strains (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) isolated from Chile Caracterización ultraestructural y molecular de cepas de *Tetraselmis* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) aisladas de Chile. **Gayana Botanica**, 72: 47-57, 2015.
- GORMAN, D.S.; LEVINE, R. P. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. **National Acad Sciences**, 54: 1965- 1969, 1965.

GOUVEIA, L., OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36, 269–274, 2009.

GUTTERRES, M. *et al.* Water reuse in tannery beamhouse process. **Journal of Cleaner Production**, 18: 1545–1552, 2010.

GUTTERRES & AQUIM, Wastewater reuse focused on industrial applications. **Water Reuse**, 2013.

GUTTERRES, M. Apostila Tecnologia do Couro II, 2014 (graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

GUTTERRES, M. *et al.* Characterization of raw wastewater from tanneries. **10th Asian International Conference on Leather Science and Technology Okayama**, 2014.

GUTTERRES, M.; BENVENUTI, J.; FONTOURA, J. T.; ORTIZ-MONSALVE S. Characterization of raw wastewater from tanneries. **Journal JSLTC**, 99:280, 2015.

HATA, J. *et al.* Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. **Biochemical Engineering Journal**, 6: 65–74, 2000.

HEIDEMANN, E. Fundamentals of leather manufacture. **Eduard Roether KG**, 1993 1993).

HENA, S; FATIMAH, S; TABASSUM S. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. **Water Resour.**, 10: 1–14, 2015.

HE B-Q, *et al.* The effect of ethanol blended diesel fuels on emissions from a diesel engine. **Atmos Environ**; 4965–71, 2003.

HU, J.; NAGARAJAN, D.; ZHANG, Q.; CHANG, J.; LEE, D. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. **Biotechnology Advances**, 2017.

HU B., ZHOU W., MIN M., DU Z., CHEN P., MA X., LIU Y., LEI H., SHI J., RUAN R. Development of an effective acidogenically digested swine manure-based algal system for improved wastewater treatment and biofuel and feed production. **Appl Energy**, 107: 255 – 263. 2013.

-
- HU Y., HAO X., LOOSDRECHT M. V., CHEN H. Enrichment of highly settleable microalgal consortia in mixed cultures for effluent polishing and low-cost biomass production. **Water Research**, 125:11-22, 2017.
- ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8): 631-635, 2000.
- ISLAM M. A., HEIMANN K., BROWN R. J. Microalgae biodiesel: Current status and future needs for engine performance and emissions. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p 1160-1170, 2017.
- JAHAN, M. A. *et al.* Characterization of tannery wastewater and its treatment by aquatic macrophytes and algae. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, 49(4), 233-242, 2014.
- KOREIVIENĖ, J.; VALČIUKAS, R.; KAROSIENĖ, J.; BALTRĖNAS, P. J., Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO₂ mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. **J. Environ. Eng. Landsc. Manag.** 22, 105–114, 2014.
- KEERTHI, V.S., MAHALAKSHMI, M., BALASUBRAMANIAN, N. Development of hybrid membrane bioreactor for tannery effluent treatment. **Desalination** 309: 231-236, 2013
- KLEIN, V. L. M.; GONZALEZ, A. A. Cultivo da microalga *tetraselmis chuii* prings em diferentes meios de cultura. **Ciência e Agronomia**, 24: 91–100, 1993.
- LEE, Y. K. Algal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 116-124, 2004.
- LEE, H. J. & S. B. HUR. Genetic relationships among multiple strains of the genus *Tetraselmis* based on partial 18S rDNA sequences. *Algae* 24: 205-212, 2009.
- LELIAERT, F., SMITH, D. R., MOREAU, H., HERRON, M. D., VERBRUGGEN, H., DELWICHE, C. F.; CLERCK, O. D. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31:1-46, 2012.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, 1043–1049, 2009.

LOFRANO, G. *et al.* Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: a review. **The Science of the total environment**, v. 461-462, p. 265–81, set. 2013.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: Rima Editora, 2006.

LOWREY, J., BROOKS, M. S., MCGINN, P. J. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewaters and associated challenges a critical review. **J. Appl. Phycol.** 27, 1485–1498, 2015.

LUBIANA, K. M. F. Culturas como alternativa para elucidação de biodiversidade críptica do fitoplâncton: o caso das águas costeiras do estado de São Paulo. **Dissertação** (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MANCOPES, F. Influência dos processos de engraxe e acabamento na modificação da estrutura e das propriedades do couro. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. **Journal Food Composition Analysis**, 14: 93-100, 2001.

MASSJUK, N. P; & LILITSKA G. G. Chorodendrophycea class new. Chorophyta, viridiplantae in the Ukrainia flora. The genus *Tetraselmis* F. Stein **Ukrainian Botanical Journal**, 63: 741-754, 2006.

MATA T. M., MARTINS A. A., CAETANO N. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renew Sustain Energy Rev**, 217–32, 2010.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84: 281 - 291, 2009.

Referências Bibliográficas

-
- MAROUBO, L.A. Estudo sobre a obtenção de biomassa microalgal como matéria-prima para a produção de biodiesel. 94 folhas. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2013.
- MEHLITZ, T. H. Influence and Heat Management Requirements of Microalgae Cultivation in Photobioreactors. San Luis Obispo, USA. 2009.
- MELLA, B.; GLANERT A. P.; GUTTERRES, M. Removal of chromium from tanning wastewater and its reuse. **Process Safety and Environmental Protection**, 95: 195–201, 2015.
- MENEZES, M & BICUDO, C.E. Flagellate green algae from four water bodies in the state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. **Hoehnea** 35(3):435-468, 2008.
- MERICÇ, S. et al. Toxicity of leather tanning wastewater effluents in sea urchin early development and in marine microalgae. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 208–217, 2005.
- MICHELON, W.; DA SILVA, M.L.B.; MEZZARI, M. P.; BEDENDO, G.C.; SOARES, H. M. Composição celular de microalgas obtidas da fitorremediação de efluentes suínícolos. **IV Symposium on Agricultural and Agroindustrial Waste Management**. Rio de Janeiro, 2015.
- MONTEIRO, M. P.; LUCHESE, R. H.; ABSHER, T. M. Effect of Three Different Types of Culture Conditions on *Spirulina maxima* Growth. **Brazilian archives of Biology and technology**, p 369-373, 2010.
- MORALES-SÁNCHEZ, D., TINOCO-VALENCIA, R., KYNDT, J., MARTINEZ, A., Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundans* using glucose as a carbon source. **Biotechnol. Biofuels**, 13: 100, 2011.
- MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. **Bioresource Technology**, 99 (10), 3949–3964, 2008.
- MULLER, P., Li, X. P., NIYOGI, K. K. Non-Photochemical Quenching: A Response to Excess Light Energy. **Plant Physiology**, p. 1558–1566, 2001.
- MUNZ, G.; GORI, R.; CAMMILLI, L. et al. Characterization of tannery wastewater and biomass in a membrane bioreactor using respirometric analysis. **Bioresour. Technol.**, 99(18): 8612- 8618, 2008.

NORRIS, R. E. Prasinophytes. **Phytoflagellates**, 2: 85–145, 1980.

OHSE, S. *et al.* Revisão: sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA**. Florianópolis, n. 36, p. 39–73, 2007.

ORTIZ-MONSALVE, S. Estudos de descoloração de corantes para couro pelo isolado nativo *Trametes villosa*. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ORTIZ-MONSALVE, S.; DORNELLES, J.; POLL, E.; RAMIREZ-CASTRILLÓN, M.; VALENTE, P.; GUTTERRES, M. Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa*. **Process Safety and Environmental Protection**, 109: 437–451, 2017.

PALUDO, M. P. Uso do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas marinhas: impacto no crescimento celular e no conteúdo lipídico. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

PANDEY, A.; LEE, D.; CHISTI, Y.; SOCCOL, C. **An open pond system for microalgal cultivation**. Grã-Bretanha: Elsevier, 2014.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, FME.; DE-BASHAN, LE.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res*; 45:11–36, 2011.

PICCIN, J.S.; GOMES, C.S.; MELLA, B., GUTTERRES, M. Color removal from real leather dyeing effluent using tannery waste as an adsorbent. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 4: 1061–1067, 2016.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, 102:17–25, 2011.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; VIEIRA, J. A. Cultivo Mixotrófico da Microalga *Spirulina sp.* LEB-18 com Adição Noturna de Diferentes Fontes de Carbono Orgânico. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal-RN, 2009.

Referências Bibliográficas

-
- RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus sp.* in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57: 630-635, 2014.
- RAVEN, J. A. Limits to growth. **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, .331-356, 1988.
- RAVEN, P.H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. A composição molecular das células vegetais. **Biologia Vegetal**. 6: 17-39, 2001.
- RICHMOND, A. Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. **Hydrobiologia**, 6:33-37, 2004.
- RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BASSI, N., PADOVANI, G.; BIONDI, N.; BONINI, G.; TREDICI, M. R. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnol. Bioeng.** 102, 100–11, 2009.
- ROSE, P.; DUNN, K.A high rate ponding unit operation linking treatment of tannery effluent and *Arthrospira* (Spirulina) biomass production. **Process development. Biomass and bioenergy**. 51: 183-188, 2013.
- SANTOS, A. M. M. M.; CORREA, A. R.; ALEXIM, F. M. B.; PEIXOTO, G. B. T. Panorama do setor de couro no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 16, p. 83-84. 2002.
- SCHMIDELL W., LIMA U. A., AQUARONE E., BORZANI W. Biotecnologia industrial, Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher Ltda. 1ª edição. v2, 541p. 2001.
- Schulze, P. S. C.; Carvalho, C. F. M.; Pereira, H.; Gangadhar, K. N.; Schüler, L. M.; Santos, T. F.; Varela, J. C. S.; Barreira, L. Urban wastewater treatment by *Tetraselmis sp. CTP4* (Chlorophyta). **Bioresource Technology**, 223:175–183, 2017.
- SENAI, Evolução dos processos de curtimento. **Revista do Couro**. 1989.
- SHARMA S., MALAVIYA P. Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. **Ecological Engineering**, 91: 419-425, 2016.

SHI, X. M. LIU, H. J. ZHANG, X. W. CHEN F. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. **Process Biochem.** 34, 341-347, 1999.

SINGH, J & GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 14: 2596-2610, 2010.

SINGH, A., VYAS D., MALAVIYA P. Two-stage phyto-microremediation of tannery effluent by *Spirodela polyrrhiza* (L.) *Schleid* and chromium resistant bacteria. **Bioresource Technology**, 216: 883-893, 2016.

SOLETTO, D., BINAGHI, L., LODI, A., CARVALHO, J. C. M., CONVERTI, A. Batch and fed- batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, 243, 217-224, 2005.

SPOLAORE, P., CASSAN, C.J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. **J. Biosci. Bioeng.** 101, 87–96., 2006.

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 21th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2005. p. 3-5-11. p. 4-130-135. p. 4-146-162.

SUALI, E. & R. SARBATLY. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 16, 2012.

SUN, J.; SIMSEK, H. Bioavailability of wastewater derived dissolved organic nitrogen to green microalgae *Selenastrum capricornutum*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Chlorella vulgaris* with/without presence of bacteria. **Journal of environmental sciences**, 57: 346-355, 2017.

SUNDARAMOORTHY, B. *et al.* Biomass characterisation and phylogenetic analysis of microalgae isolated from estuaries: Role in phycoremediation of tannery effluent. **Algal Research**, v. 14, p. 92–99, 2016.

SYM, S. D.; Pienar, R. N. Cell and Scale Morphology of an Isolate of *Halosphaera* (Prasinophyceae, Chlorophyta) from South Africa. **South African Journal of Botany**, 63(6) 410-415, 1997.

Referências Bibliográficas

TOMASELLI, L., The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, 1. ed., Oxford, Ed. **Blackwell Science Ltd.**, p. 2- 19, 2004.

VON SPERLING, M. Princípios da remoção biológica de nutrients. In: Lodos ativados, 2ed. vol. 4. Departamento de engenharia sanitária e ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008

WANG, B. AND C. Q. LAN. Biomass production and nitrogen and phosphorus removal by the green alga *Neochloris oleoabundans* in simulated wastewater and secondary municipal wastewater effluent. **Bioresource Technology** 102(10): 5639-564, 2011.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science** 329, 796–799. 2010.

WHITTON, B. A. Ecology of Cyanobacteria II. Springer, New York, 2012.

WINTER, C. Caracterização de filmes poliméricos utilizados em acabamento de couros. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014

YAN, R. et al. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. Journal of Applied Phycology, v. 26, n. 9, 2011.

YEN H.W., HU, I. C. CHEN, C. Y. HO, S. H. LEE, D. J. CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery from biofuels to natural products. **Bioresource Technology**., 135, 166-174, 2013.

YOO, C., JUN, S.; LEE, J.; AHN, C.; OH, H. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, 101: 71-74, 2010

ZITTELLI G.C., RODOLFI L., BIONDI N., TREDICI M.R.; Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. **Aquaculture**, 261(3):932–43, 2006.