

GIL MONTEIRO GRENCHO

*DIMENSIONAMENTO DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE
UM EFLUENTE DE AQUACULTURA DE ESTURJÃO*



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Faculdade de Ciências e Tecnologia
2016

GIL MONTEIRO GRENCHO

*DIMENSIONAMENTO DE UM SISTEMA DE TRATAMENTO DE
UM EFLUENTE DE AQUACULTURA DE ESTURJÃO*

Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente

Trabalho efetuado sobre orientação de:

Maria Margarida dos Prazeres Reis

Paulo Miguel Zaragoza Pedro



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

2016

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito.

Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Gil Monteiro Grencho

A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo:

A aquacultura tem tido um grande crescimento nos últimos anos, em resultado da crescente procura de produtos piscícolas e da depleção dos *stocks* tradicionais de pesca. Simultaneamente com este crescimento desenvolveram-se numerosas tecnologias de tratamento de efluentes de piscicultura, que incluem a minimização dos caudais descarregados e a remoção de nutrientes por diversos tipos de biofiltros.

Neste projeto, em parceria com a Caviar Portugal, uma *spinoff* criada na Universidade do Algarve, estudou-se diversas tecnologias de biofiltros para delinear a melhoria de um sistema de tratamento do efluente desta aquacultura, com o objetivo de introduzir no seu circuito um destes biofiltros, de modo a que todo o sistema se comporte como um sistema integrado de aquacultura com recirculação de água (RAS), com água de qualidade compatível com a aquacultura de esturjão.

Nesse sentido, realizaram-se experiências confinadas em que se avaliou a remoção, a partir do efluente da Caviar Portugal, quer de compostos azotados inorgânicos, quer de fosfato inorgânico através de filtros biológicos. Estes incluíram diferentes espécies da microalga do género *Scenedesmus* e diferentes variedades de alfaces. Esta avaliação destinou-se também a obter variáveis a utilizar no dimensionamento de um destes filtros para o integrar no circuito RAS da Caviar Portugal.

Optou-se por dimensionar um biorreator de microalgas do género *Scenedesmus* para remover o excesso de nutrientes do efluente da Caviar Portugal obtendo níveis de nutrientes compatíveis com os objetivos.

Os resultados permitiram estimar um volume de $V_r = 47 \text{ m}^3$ com um tempo máximo de retenção hidráulica de $\theta = 4,7$ dias para um biorreator com a espécie de *Scenedesmus*, considerada mais rústica, por só recentemente ter sido concentrada a partir de amostras do Rio Ardila (Alentejo, Portugal).

Palavras chave: Aquacultura, Sistemas RAS, Biofiltros, *Scenedesmus*, Efluentes

Abstract:

Aquaculture had a great growth over the last years, in result of an increasing demand of fish products and the depletion of traditional fish stocks. Numerous technologies have been developed in order to deal with aquaculture wastewaters, including the minimization of discharged flow and treatment techniques for nutrient removal from wastewater, based on different types of biofilter technologies.

In a partnership with Caviar Portugal, a spinoff created at the University of Algarve, this project studied several types of biofilters in order to design a bioreactor using one of these biofilters to be added to a sturgeon freshwater aquaculture wastewater treatment system. The global aim was to obtain an adequate water quality, compatible with the recirculation of the wastewater of Caviar Portugal.

Several experiments were performed to assess the removal of nutrients from the effluent by algae species of the genus *Scenedesmus* and two different lettuce varieties.

Results obtained from these experiments allowed the selection of the more rustic species of *Scenedesmus* sp., recently concentrated from samples collected from the Ardila River (Alentejo, Southern Portugal). The designed bioreactor, using this species should have an estimated optimal volume $V_r = 47,0 \text{ m}^3$ for a maximal hydraulic retention time of $\theta = 4,7$ days.

Key words: Aquaculture, RAS systems, Biofilters, *Scenedesmus*, Effluent

Índice:

1	Enquadramento geral e objetivos	1
1.1	Enquadramento geral.....	1
1.2	Objetivos	2
2	Sistemas de aquacultura.....	3
2.1	Sistemas de jaulas/gaiolas flutuantes:.....	4
2.2	Raceways (sistemas de fluxo direcional):.....	4
2.3	Sistemas com recirculação da água (RAS):	5
2.4	Sistemas integrados multitróficos de aquacultura (IMTA):.....	5
2.5	Sistemas de lagunagem.....	6
3	Efluentes de aquacultura e seus impactos	7
3.1	Efluentes de Aquacultura	7
3.2	Impactes dos efluentes não tratados de aquacultura	8
3.3	Tecnologias de tratamento dos efluentes de aquacultura para remoção de nutrientes	9
3.3.1	Remoção biológica de nitrato:	10
3.3.2	Remoção de Fosfatos:.....	11
3.3.3	Processo de nitrificação:.....	11
3.3.4	Biofiltro de areia fluidizada.....	12
3.3.5	Biofiltros de leito móvel.....	12
3.3.6	Biofiltros de leito fixo.....	14
3.3.7	Microalgas na remoção de nutrientes da água	16
4	Características da instalação da Caviar Portugal	18
4.1	Breve descrição do processo de produção.....	18
4.2	Características do efluente da Caviar Portugal	19
5	Trabalho experimental e obtenção de variáveis	22
5.1	Material e métodos.....	22
5.1.1	Material biológico.....	22
5.1.2	Delineamento experimental	24
5.1.3	Experiência nº 1.....	24
5.1.4	Experiência nº 2.....	26
5.1.5	Experiência nº 3.....	27
5.2	Resultados e discussão	31
5.2.1	Experiência nº 1.....	31
5.2.2	Experiência nº 2.....	33
5.2.3	Experiência nº 3.....	37

6	Dimensionamento do Sistema de tratamento.....	44
6.1	Metodologia de Dimensionamento	44
6.2	Resultados	50
6.3	Discussão	52
7	Conclusões e perspectivas futuras	55
8	Bibliografia	56

Índice de figuras

Figura 2.1- Representação de vários sistemas de aquacultura: Sistemas onshore: A. Raceways, B. Sistemas de lagunagem, C. Jaulas/Gaiolas. Sistemas em terra: D. Sistemas de Recirculação e/ou Sistemas Multitrofos. Sistemas offshore: C. Jaulas/Gaiolas.	6
Figura 3.1- Esquema do ciclo do azoto numa aquacultura de peixe (TAN – azoto amoniacal total “total ammonia nitrogen”)	9
Figura 3.2 – Esquema de um biofiltro de leito móvel. (adaptada Pfeiffer & Wills, 2011)	13
Figura 3.3 – Princípio dos reatores de leito móvel: a) aeróbio e b) anaeróbio	13
Figura 3.4 – Vários tipos de biofiltros de leito móvel (adaptado de Malone & Pfeiffer, 2006)	14
Figura 3.5 – Alternativas de reatores de criação algas: bacias, tubulares horizontais/verticais e “colchões” (http://www.transnatural.nl/data/images/algaeparc.jpg)	17
Figura 4.1 – Atual sistema RAS da Caviar	18
Figura 4.2 - Potencial futuro sistema RAS de produção da Caviar Portugal.....	19
Figura 4.3 – Relação entre a razão C:N e competitividade microbiana nitrificante (figura adaptada de Strauss & Lamberti 2000).....	21
Figura 5.1 Imagem em microscopia ótica de contraste de fase (Leitz, Laborlux K, condensador ACHROPLAN) de uma amostra do Inóculo X em câmara de Neubauer, fixada com solução de Lugol em que se verifica a dominância por <i>Scenedesmus</i> sp. 23	
Figura 5.2 - Imagem em microscopia de campo claro de uma amostra in vivo Inóculo Y maioritariamente dominado por <i>Scenedesmus</i> sp.	23
Figura 5.3 – Foto da experiência nº 1, (i) Brancos à esquerda (garrafões forrados com folha de alumínio) (ii, iii) Replicados das diferentes situações à direita (vasos).....	25
Figura 5.4 – Foto da experiência nº 2, à esquerda os replicados das diferentes situações com Alga X (ii, iii), ao meio, (iv) situação de rolhas de cortiça, à direita Brancos (i)	26
Figura 5.5 – Experiência nº 3, Brancos(i), Alga X(ii) e Y(iii), Alfaces Verde (iv) e Roxa (v)	28
Figura 5.6 - Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-} na experiência nº1	32
Figura 5.7 – Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} e N total na experiência nº2	35
Figura 5.8 – Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} e N total na experiência nº 3.....	39
Figura 5.9 – Crescimento das situações com Alga X, Y e pH	40
Figura 5.10 – Gráficos do crescimento das Algas X e Y em comparação com a remoção de N total e P total.....	41
Figura 5.11 - Variação da concentração de N e P e crescimento das alfaces verde e roxa ao longo do tempo.	42
Figura 6.1 - Esquema de um reator sem recirculação, de acordo com Metcalf & Eddy 1995.	47
Figura 9.8.1 – Fotografia do protocolo de criação do meio F2	1

Índice de tabelas

Tabela 3-1- Reatores de desnitrificação em diversos sistemas recirculantes de acordo com van Rijn et al., 2006)	15
Tabela 3-2 - Rácios de desnitrificação por alguns reatores desnitrificantes em água doce (segundo van Rijn et al., 2006).....	15
Tabela 3-3 - Rácios de desnitrificação por alguns reatores desnitrificantes em água salgada (segundo van Rijn et al., 2006).....	16
Tabela 4-1 - Parâmetros típicos do efluente bruto da Caviar Portugal, período 19-04-2016 a 02-06-2016	19
Tabela 4-2 – Valores limite de emissão, na descarga de águas residuais, Decreto-Lei n.o 236/98, ANEXO XVIII.....	20
Tabela 4-3 - Parâmetros hidroquímicos da entrada de água doce e de água reciclada em módulos com RAS. (Caviar Portugal, 2016).....	20
Tabela 5-1 - Tabela de parâmetros laboratoriais da experiência nº 1	25
Tabela 5-2 - Tabela de parâmetros laboratoriais da experiência nº 2	27
Tabela 5-3 – Parâmetros de análise laboratorial, método de análise, equipamento, Limites de quantificação e deteção, unidades e periodicidade de análise.....	29
Tabela 5-4 – Parâmetros registados, de leitura direta e climatéricos	30
Tabela 5-5 – Medidas do crescimento das Alfaces Verde e Roxa.....	42
Tabela 6-1 – Razão de N:P e determinação do nutriente limitante.....	50
Tabela 6-2 – Taxas de crescimento das algas X e Y e concentração correspondente do nutriente limitante	51
Tabela 6-3 – Valores obtidos para diferentes μ e simulação de vários cenários.	51

Lista de abreviaturas

AEB – Água de esturjão do efluente do biofiltro da Caviar Portugal

AEE – Água de esturjão do efluente esterilizada do biofiltro da Caviar Portugal

AEEE – Água de esturjão do efluente esterilizada e envelhecida do biofiltro da Caviar Portugal.

Alga X – Inóculo de Algas X maioritariamente dominado por *scenedesmus* sp., diferente de Alga Y.

Alga Y – Inóculo de Algas Y maioritariamente dominado por *scenedesmus* sp., diferente de Alga X.

CO₂ – Dióxido de Carbono

comp. – Comprimento cm

DOM – Matéria orgânica dissolvida

DOP – Matéria orgânica particulada

evap. – Evaporação mL

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

FSBs – Biofiltros de leito fluidizado

humid. – Humidade relativa %

IMTA – Sistema integrado multi-trófico de aquacultura

LAQ – Laboratório de análises químicas da Universidade do Algarve, *Campus Gambelas*

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

N – Azoto (total)

N₂ – Azoto molecular

NH₄⁺ – Amónia

NO₂⁻ – Nitrito

NO₃⁻ – Nitrato

O₂ – Oxigênio molecular

P – Fósforo

PET – Polietileno

PO₄³⁻ – Fosfato

rad. – Radiação Solar W/m²

RAS – Sistema com recirculação de água em aquacultura

SST – Sólidos suspensos totais

SSV – Sólidos suspensos voláteis

TAN – azoto amoniacal total (*total ammonia nitrogen*)

temp. – temperatura °C

Vol. – Volume

Δ – Valores médios

Expressões:

x = Densidade populacional (nº de células)

t= Tempo

μ = Taxa de crescimento específico (t⁻¹)

μ_{max} = Taxa de crescimento específico máxima (t⁻¹)

S = Concentração do substrato limitante (mg/L)

K_s = Constante de meia velocidade

K_d = coeficiente de decaimento endógeno (t⁻¹)

X = concentração de células (massa/Vol.)

$r'g$ = rácio de crescimento bacteriano (massa/Vol. t)

μ' = taxa de crescimento líquido (t^{-1})

dX/dt = rácio de troca de concentração de microrganismos no reator

V_r = Volume do reator

Q = Caudal (Vol./ t)

X_0 = Concentração de microrganismos que entra (células/Vol.)

X = concentração de microrganismos no reator (células /Vol.)

$R'g$ = taxa líquida do crescimento dos microrganismos (células/Vol. t)

S = concentração no efluente do reator, mg/L

Q = Caudal à entrada e saída (Vol./t)

V_r = Volume do reator

θ = Tempo de retenção hidráulico (t)

K_d = coeficiente de decaimento endógeno

1 Enquadramento geral e objetivos

1.1 Enquadramento geral

No setor da produção animal, a aquacultura tem tido o maior crescimento em todo o mundo, sendo previsível que venha a ser a principal fonte de animais aquáticos para o consumo humano. A depleção dos *stocks* de pesca e a procura contínua de produtos piscícolas, levou a que a aquacultura se expandisse rapidamente nos últimos anos (Ottinger et al. 2015). Atualmente cultivam-se mais de 220 espécies de marisco e de peixe, sendo o esturjão um deles (Naylor et al. 2000).

As aquaculturas de esturjão têm elevado interesse económico, e a produção anual de aquacultura de esturjão é de 80 a 100 toneladas, excedendo a cota legal de pesca para o ano de 2006 na área do Cáspio (Bronzi et al. 2011).

As ovas destes peixes (chamadas de caviar) são consideradas uma iguaria nos países ocidentais. Estima-se que o comércio legal de caviar feito pela Rússia, Irão, Cazaquistão, China e Roménia seja de 114 toneladas anuais (CITES, 2004), atingindo o comércio ilegal 300 toneladas por ano (Hamilton, 2003).

O crescimento da piscicultura vem com os seus impactos ambientais, já que os efluentes de aquacultura contribuem com resíduos tóxicos e compostos orgânicos (Cole et al., 2009). Estes por sua vez libertam excesso de nutrientes (principalmente nitratos e fosfatos) que podem gerar consequentes fenómenos de eutrofização. Esta resulta do desenvolvimento de florescências ou *blooms* de algas nos ecossistemas aquáticos, com consequente redução da qualidade da água, depleção em oxigénio e destruição dos habitats (Boesch et al., 2001; Aubin, 2006 in Cole et al., 2009).

Depressa se ganhou consciência do impacto ambiental deste tipo de efluentes, tendo-se desenvolvido um conjunto de tecnologias de tratamento de modo a minimizar este impacte.

A minimização deste tipo de impactes baseia-se por um lado em tecnologias de tratamento com remoção de nutrientes, por outro na

minimização do volume de efluentes através da recirculação da água após tratamento.

1.2 Objetivos

Pretende-se com este trabalho contribuir para a minimização de impactes dos efluentes de uma aquacultura de esturjão, concretamente da empresa Caviar Portugal, através do delineamento de um sistema de remoção de nutrientes a incluir numa das fases do seu sistema de tratamento, de modo a que todo o sistema se comporte como um sistema integrado de aquacultura com recirculação de água (RAS), cujo sucesso permitirá não só minimizar os impactes ambientais deste efluente, mas também minimizar o consumo de água.

Este objetivo global envolveu os seguintes objetivos específicos:

- (i) Avaliação da qualidade do efluente para suporte biológico de microrganismos;
- (ii) Avaliação de diversos substratos para biofiltros;
- (iii) Comparação da eficiência de remoção de nutrientes realizada por diferentes espécies;
- (iv) Seleção da espécie que permite obter um efluente com melhor qualidade;
- (v) Dimensionamento de um biofiltro com a espécie selecionada.

Assim, para esclarecimento destes objetivos começou-se por uma breve descrição dos sistemas mais frequentemente utilizados em aquacultura (**secção 2**), descrevendo de seguida os possíveis impactes dos seus efluentes e os conceitos associados à sua mitigação (**secção 3**), e finalmente focou-se o estudo no caso concreto do efluente da Caviar Portugal (**secção 4**). O trabalho experimental realizado no sentido de obter valores para as variáveis em estudo, foi descrito na **secção 5** que inclui os respetivos materiais e métodos, resultados e discussão. Estes resultados constituíram a base do dimensionamento do sistema de tratamento selecionado (**secção 6**). Na **secção 7** foram finalmente compiladas as conclusões e as perspetivas futuras relativamente ao objetivo proposto.

2 Sistemas de aquacultura

A aquacultura surgiu primariamente no continente asiático para produção de alimento em sistemas de água doce. Técnicas que eram utilizadas para o sustento de famílias em pequena escala foram aperfeiçoadas e são atualmente usadas em larga escala para fazer face à procura mundial de produtos piscícolas (Subasinghe et al. 2009). Hoje em dia a aquacultura é utilizada em todos os continentes e possui uma grande variedade de tipos de produção assim como de diferentes técnicas e sistemas de cultura.

A escolha do tipo de sistema a utilizar tem por base critérios como os custos iniciais e de produção, a qualidade e a quantidade de efluente, o consumo de água, o espaço disponível, a espécie em cultivo, a eficiência de crescimento/produção e o controlo de pestes, entre outros (Crepaldi & Teixeira 2006).

Os sistemas de aquacultura podem ser muito diversos, sendo frequentemente descritos em função da intensidade de produção (Edwards et al., 1988). De facto, a intensidade de produção varia de acordo com os *inputs* nutricionais e a densidade das culturas, e podem ser classificadas como extensivas, semi-intensivas e intensivas (Prein M., 2007, Edwards et al., 1988).

Os sistemas extensivos têm menores custos de produção e, em geral, não usam *inputs* adicionais para influenciar o crescimento das culturas, mas em contrapartida possuem uma taxa de crescimento menor, assim como menor densidade. O crescimento dependerá maioritariamente do alimento já presente na água (Edwards et al., 1988).

Para culturas semi-intensivas usam-se sistemas onde é fornecido alimento adicional às culturas, que por isso possuem maior taxa de crescimento e atingem maiores densidades que os sistemas extensivos (Edwards et al., 1988), mas que muitas vezes se limitam a utilizar estruturas de represamento da água que eflui na maior parte dos casos sem qualquer tratamento.

Na aquacultura intensiva, não só se alimenta as culturas como se trata da manutenção da qualidade da água. Estes sistemas conseguem atingir grandes densidades de cultura exigindo maior controlo sobre as condições de

crescimento (Prein M., 2007). Sendo sistemas de maior rendimento, são também mais sensíveis e exigem uma gestão competente.

Quanto à metodologia de cultivo descrevem-se aqui sumariamente os principais tipos de tecnologias utilizados em piscicultura, nomeadamente os sistemas de jaulas ou gaiolas flutuantes, os *raceways* ou sistemas de fluxo direcional, os sistemas com recirculação da água, os sistemas integrados multitróficos e os sistemas de lagunagem.

2.1 Sistemas de jaulas/gaiolas flutuantes:

Culturas em jaula/gaiolas (C, na figura 2.1) servem para manter cativas as culturas que são produzidas, estas são usadas tanto em rios como no mar assim como em sistemas costeiros *near shore* e *off shore*. Este tipo de piscicultura teve origem na Ásia, onde as famílias mantêm o peixe cativo em jaulas para consumo doméstico (Halwart et al. 2007). Nestes sistemas não existe controlo sobre o efluente e os consumos de água são dependentes das correntes da envolvente onde se encontram as jaulas (Halwart et al. 2007). Hoje em dia, a aquacultura em jaula tem uma grande expressão a nível mundial, é praticada intensivamente, e estima-se que tenha sido responsável por 70% da produção de aquacultura do Canada em 2004 e entre 80 a 90% da produção de peixes na Ásia (Halwart et al. 2007).

2.2 Raceways (sistemas de fluxo direcional):

Sistemas de fluxo direcional (A na figura 2.1), conhecidos como *raceways*, são sistemas onde a água flui através de uma estrutura de aquacultura com uma taxa de renovação que permite manter o nível de qualidade da água desejado. Estes sistemas requerem grandes quantidades de água que, em geral, são desviadas de rios para os canais de aquacultura. O efluente deste tipo de aquacultura tem uma apresentação aparentemente limpa, o que se deve à sua grande diluição (Mirzoyan et al. 2010). Nestes sistemas é possível tratar o efluente, no entanto, raramente se verifica esta prática (Gross, 2001).

2.3 Sistemas com recirculação da água (RAS):

Sistemas com recirculação da água (D na figura 2.1) em aquacultura são sistemas intensivos que conseguem atingir altas taxas de reutilização da água devido ao uso de diferentes técnicas mecânicas, biológicas e químicas no seu tratamento ou filtração (Yeo et al. 2004). Pode-se controlar de forma precisa o ambiente da espécie aquática em cultura dando aos operadores a opção de influenciar o comportamento da cultura fora de época por forma a acompanhar as exigências de mercado (Yeo et al. 2004).

De acordo com Murray, Bostock, & Fletcher (2014), os RAS têm a enorme vantagem de serem compatíveis com os objetivos de uma aquacultura sustentável, sendo que é possível obter taxas de água reciclada superiores a 90%.

Em resumo os RAS reduzem o consumo de água, as descargas de efluentes, e os custos de produção (Eding et al., 2006). Obviamente a sua viabilidade depende das características do efluente, sendo necessário garantir a ausência de toxicidade e de agentes biológicos que possam pôr em causa a saúde da cultura.

2.4 Sistemas integrados multitróficos de aquacultura (IMTA):

Sistemas integrados multitróficos (D na figura 2.1) de aquacultura (em inglês abreviado para IMTA, *integrated multi-trophic aquaculture*), nasceram como uma solução de boas práticas em aquacultura. O princípio base destes sistemas é a incorporação na aquacultura das várias funções desempenhadas num ecossistema pelos sistemas biológicos de uma grande diversidade de organismos. Na prática combinam-se vários sistemas de aquacultura de organismos representantes de diferentes níveis tróficos, em que uns podem até servir de alimento à cultura mais valorizada ou a espécies por ela consumidas, e outros, cultivados apenas para remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos, podem ser valorizados por exportação para outras cadeias tróficas. Desta forma reduz-se a quantidade de resíduos assim como ocorre a valorização dos mesmos (Chopin et al. 2001). Em suma nos IMTA todos os componentes

integrados possuem valor de mitigação de impactos e/ou valor comercial (Chopin et al. 2010).

2.5 Sistemas de lagunagem

A utilização de lagoas de grande ou menor escala em aquacultura designa-se vulgarmente como sistema de lagunagem, o que pode gerar alguma ambiguidade com os sistemas de lagunagem passivos usados no tratamento de águas residuais industriais e urbanas.

As lagoas destes sistemas de aquacultura (B na figura 2.1) são, em geral, tanques escavados no solo. Estas lagoas podem ser cheias passivamente por água subterrânea, caso atravessem um lençol de água perto da superfície, por água de furos para elas bombeada ou simplesmente pelo desvio de águas superficiais naturais através de canais expressamente construídos. Podem variar tanto em área como em profundidade de acordo com as necessidades da espécie a cultivar. A sua capacidade de retenção da água depende da composição do fundo da lagoa e da impermeabilização aplicada, assim como do nível freático. A capacidade de produção da lagoa depende dos objetivos e do investimento realizado, sendo que estes sistemas podem ser intensivos, semi-intensivos ou extensivos (Egna & Boyd, 1997).

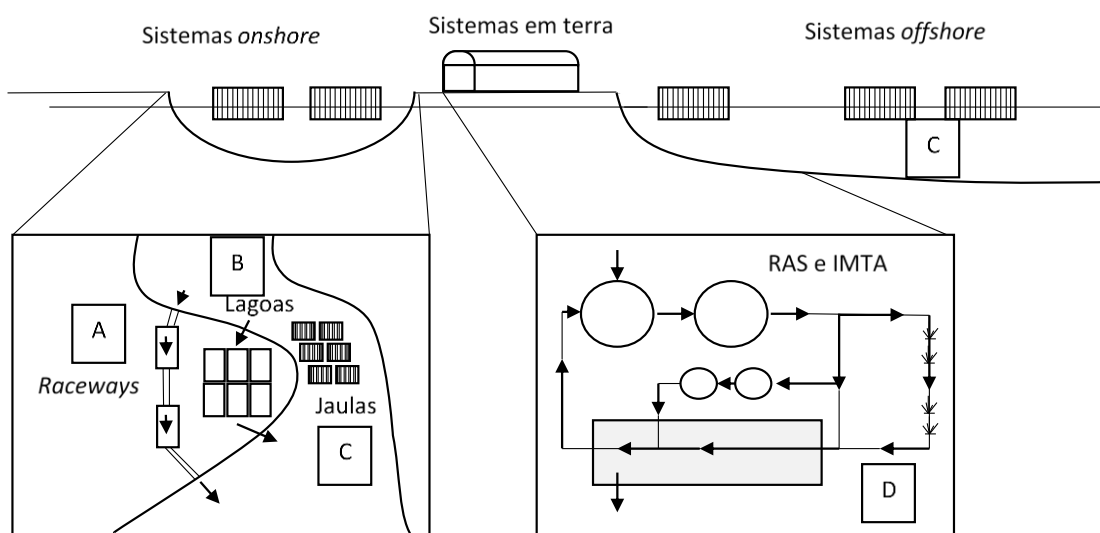


Figura 2.1- Representação de vários sistemas de aquacultura: Sistemas onshore: A. Raceways, B. Sistemas de lagunagem, C. Jaulas/Gaiolas. Sistemas em terra: D. Sistemas de Recirculação e/ou Sistemas Multitrofos. Sistemas offshore: C. Jaulas/Gaiolas.

3 Efluentes de aquacultura e seus impactos

3.1 Efluentes de Aquacultura

Nos sistemas de produção de aquacultura, a acumulação de nutrientes é sobretudo notória em sistemas fechados onde pouca água é substituída e em que mormente são acumulados compostos de azoto (N) e de fósforo (P) (Lemarie et al., 1998).

Os principais constituintes problemáticos presentes nos efluentes de sistemas RAS são a matéria orgânica dissolvida e particulada (respetivamente DOM, POM ou SSV), os sólidos suspensos totais (SST), nutrientes como azoto (N) e fósforo (P) e compostos específicos orgânicos e inorgânicos tais como antibióticos (Piedrahita 2003).

Os peixes em cultura, apenas convertem entre 10 a 35% dos compostos de azoto e fósforo em biomassa, sendo que o restante é excretado e dissolvido nas formas orgânicas e inorgânicas, assim como matéria particulada que fica nos tanques de cultura (Holby and Hall, 1991).

No que diz respeito às formas de azoto dissolvidas na água, uma grande parte é amónia (NH_4^+) sendo que esta é o produto final do catabolismo proteico dos peixes, havendo também como produtos da sua oxidação nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-). Para além destas há a considerar o azoto orgânico de fezes e o excesso da alimentação sedimentados no fundo dos tanques de cultura (Hall et al., 1992; Hargreaves, 1998).

O fósforo, constituinte das fezes assim como do alimento, está presente maioritariamente na forma de fosfato (PO_4^{3-}), tanto dissolvido como sedimentado no fundo do tanque de cultura (Holby and Hall, 1991).

A amónia e nitritos são tóxicos para as culturas de peixes em concentrações de $2 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ para espécies de água doce e $20 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{L}^{-1}$ para espécies marinhas (Buhmann & Papenbrock 2013).

A quantidade destes constituintes descarregada no efluente não é constante e apresenta grande variabilidade. A retenção de N e P em biomassa (percentagens retidas em relação à quantidade de N e P presentes na ração) varia no caso de N entre 10% a 49% e no de P entre 17% a 40%. Do mesmo modo, as quantidades de N e P presentes nas fezes variam entre 3,6% a 35%

e 15% a 70%, respetivamente. Por último as concentrações dissolvidas de N e P nas secreções variam entre 37% a 72% e 1% a 62%, respetivamente. (Skonberg et al., 1997; Bureau and Cho, 1999; Sugiura et al., 1999 in Piedrahita, 2003).

Estes números são bastante variáveis no entanto idealmente os avanços na qualidade das rações tenderão a aumentar os valores de retenção em biomassa e a reduzir as perdas (Skonberg et al., 1997; Bureau and Cho, 1999; Sugiura et al., 1999 in Piedrahita, 2003).

3.2 Impactes dos efluentes não tratados de aquacultura

Os efluentes de aquacultura não tratados contribuem para a degradação do ambiente, os seus efeitos negativos incluem poluição orgânica e eutrofização, provocam uma acumulação excessiva de nutrientes e compostos de fósforo no ecossistema.

Estes problemas em conjunto com poluição química podem causar *blooms* de algas e a depleção do oxigénio, reduzindo a qualidade da água com morte de espécies e destruição de habitats (Boesch et al., 2001; Aubin, 2006 in Cole et al. 2009). Neste tipo de ambientes proliferam certos microrganismos que são diretamente prejudiciais para os peixes através de toxinas biológicas e neurológicas (Aubin, 2006 in Cole et al., 2009). Os principais produtores de biotoxinas planctónicas pertencem aos grupos dos dinoflagelados, diatomáceas e cianobactérias (Caetano, 2015).

Outra das preocupações com os efluentes de aquacultura são a quantidade de produtos químicos usados que podem contribuir para a poluição do ambiente. Estes produtos provêm de antibióticos, herbicidas, hormonas, anestésicos, pigmentos, minerais e vitaminas (Goldberg et al., 2001; JSA, 2007). O uso de antibióticos pode afetar as espécies indesejadas de microrganismos, mas também levar à resistência aos antibióticos assim como causar outros efeitos tóxicos (Brown, 1989). Dixon (2000) reporta que esta pode ser a causa pela qual cada vez mais agentes patogénicos têm ficado resistentes a muitas drogas usadas.

Além disso, a poluição em aquacultura não se resume à poluição pelos efluentes, sistemas de aquacultura abertos podem afetar todo o ecossistema

em redor. Por exemplo, os sistemas de jaulas provocam sedimentação acrescida devido à cultura e alimentação intensiva, aumentando a carência bioquímica de oxigénio assim como a carga de nutrientes no ecossistema. A má gestão destes sistemas pode por sua vez causar autopoluição e transmissão de doenças (T.V.R. Pillay, 2004).

Referiram-se aqui os sistemas abertos por estes apesar de nem possuírem um efluente *per se*, influenciarem negativamente o ambiente em redor.

3.3 Tecnologias de tratamento dos efluentes de aquacultura para remoção de nutrientes

As tecnologias de remoção de nutrientes num sistema RAS têm por base o conhecimento do modo como se processa o ciclo do azoto nestes sistemas. A Figura 3.1, adaptada de (Crab et al., 2007) esquematiza o ciclo de N num tanque de aquacultura de peixes.

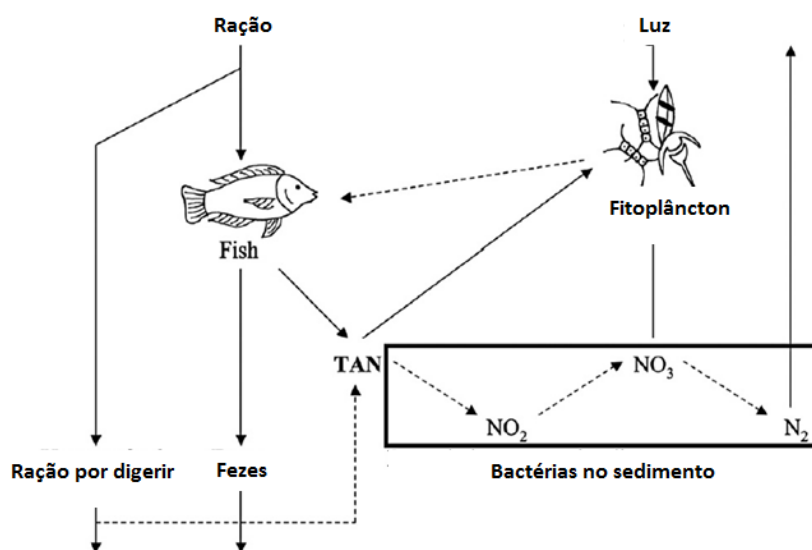


Figura 3.1- Esquema do ciclo do azoto numa aquacultura de peixe (TAN – azoto amoniacal total “total ammonia nitrogen”)

De acordo com a figura 3.1 e como anteriormente referido, considera-se que o azoto que entra no sistema é proveniente do alimento, sendo parte deste consumido. Grande parte fica dissolvido na água ou acaba por se depositar no fundo do tanque. Do azoto que é consumido parte é transformado em

biomassa enquanto o restante é excretado. O alimento por consumir, assim como as fezes contribuem para a carga orgânica do sistema, que por sua vez é decomposta pelos microrganismos, aumentando os níveis totais de amónia (Crab et al. 2007). A maioria dos organismos nitrificantes são quimioautotróficos aeróbios estritos, tendo, portanto, como aceitador final de eletrões da sua respiração O_2 , fixam CO_2 para a sua biossíntese e oxidam uns NH_4^+ a NO_2^- e outros NO_2^- a NO_3^- (como se descreverá na secção *processo de nitrificação*). A figura 3.1 representa ainda a desnitrificação anaeróbia do nitrato, que ocorre no sedimento, com libertação de azoto molecular (N_2).

3.3.1 Remoção biológica de nitrato:

A remoção biológica de nitrato é feita por uma grande variedade de microrganismos. Existem dois processos pelos quais os microrganismos reduzem o nitrato, por assimilação e por dissimilação. Cerca de 20% dos microrganismos preferem usar o nitrato por assimilação, em vez de amónia como fonte de azoto, apesar de na maioria dos organismos, este processo ocorrer apenas quando não existem formas de azoto mais reduzidas como a amónia. A redução do nitrato pode acontecer tanto num ambiente aeróbio como anaeróbio, mas a desnitrificação com libertação de azoto molecular só é eficiente em anaerobiose. Neste processo não existe a redução de formas orgânicas de azoto.

A remoção de nitrato por dissimilação refere-se à redução do nitrato para outra forma inorgânica de azoto em simultâneo com a libertação de energia. Por dissimilação existe um grupo de microrganismos em que o nitrato é reduzido ou para nitrito ou para amónia, enquanto noutro grupo o nitrato é reduzido através do nitrito e compostos gasosos de N a azoto molecular como produto final (N_2) (van Rijn et al. 2006).

O processo dissimilativo deste segundo grupo de microrganismos redutores de nitrato designa-se por desnitrificação e é realizado por uma grande variedade de procariontes. A maioria destes organismos são anaeróbios facultativos e usam o nitrato como aceitador final de eletrões da sua respiração anaeróbia. A desnitrificação tem, pois, como produto final o azoto molecular (N_2). No entanto, há produção de compostos intermédios, podendo ocorrer

acumulação de nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) e óxido nitroso (N_2O) antes de se libertar finalmente N_2 (Korom, 1992).

Em ambientes com pouco carbono dissolvido prevalecem desnitrificantes autotróficos que são capazes de usar compostos inorgânicos, por exemplo Mn^{2+} , Fe^{2+} , SO_4^{2-} como fonte de eletrões e CO_2 como fonte de carbono biossintético (Korom, 1992).

3.3.2 Remoção de Fosfatos:

A remoção biológica de fosfatos em efluentes é praticada num processo faseado, em que o efluente é sujeito alternadamente a condições anaeróbias e aeróbias. Em condições aeróbias promove-se a acumulação de fosfatos sob a forma de grânulos de polifosfato nos microrganismos. Estes são utilizados no crescimento das próprias bactérias na fase anaeróbica, sendo posteriormente o fósforo removido do efluente ao ser recolhida parte da biomassa bacteriana (Toerien et al., 1990).

3.3.3 Processo de nitrificação:

Em aquacultura o processo de nitrificação é feito com recurso a biofiltros. Biofiltros em geral, são suportes para que a atividade biológica possa acontecer, servem essencialmente de substrato para a adesão de microrganismos que se desenvolverão utilizando as substâncias dissolvidas no efluente. A seleção destes microrganismos é feita passivamente de acordo com as condições criadas para os mesmos.

A capacidade de nitrificação de um biofiltro depende do biofilme aderido. Este consiste numa película de microrganismos composta quer por biomassa já inerte, quer por um consórcio em camadas de microrganismos, em que se incluem microrganismos heterotróficos e nitrificantes autotróficos (Lee *et al.*, 2004). A dominância por bactérias heterotróficas com elevada taxa reprodutiva ou por bactérias nitrificantes (autotróficas oxidadoras da amónia e nitrito) dependerá da disponibilidade em carbono orgânico, sendo as bactérias heterotróficas um importante fator na espessura do biofilme (Malone & Pfeiffer 2006).

Existem vários tipos de biofiltros usados em RAS (Malone & Pfeiffer 2006), nomeadamente *biofiltros de areia fluidizada*, *biofiltros de leito móvel* e *biofiltros de leito fixo*, que se descrevem de seguida.

3.3.4 Biofiltro de areia fluidizada

Os biofiltros de areia fluidizada (FSBs - *Fluidized-sand beds biofilter*) são uma forma eficiente, relativamente compacta e rentável de remover substâncias dissolvidas em RAS especialmente em águas que requerem que se mantenham baixos níveis de amónia e nitrito (Summerfelt 2006).

Conseguem remover entre 50 a 90% da amónia total e atingir concentrações na descarga de 0,1 a 0,5 mg/l de NH_4^+ e 0,1 a 0,3 mg/l de NO_2 (Heinen et al., 1996; Summerfelt et al., 2004). Os FSBs conseguem ser mais económicos e mais compactos que outros tipos de biofiltro, podendo individualmente ser usados tanto para tratamento de pequenos como grandes caudais de água até caudais de 190L/s.

3.3.5 Biofiltros de leito móvel

Biofiltros de leito móvel (*Moving Bed Biofilters*) são, em geral, tanques com biobolas em material diverso a que é fornecida uma certa agitação. Têm a capacidade de funcionar tanto em regime aeróbio como anaeróbio. Estes biofiltros possuem grande sucesso mantendo-se de relativamente baixo custo. (Ling, 2005; Rusten et al., 2006).

O leito é continuamente agitado de maneira a formar um fluxo uniforme circular ou toroidal, através de um fluxo central e ascendente gerado por difusores. Este serve também o propósito de limpar o excesso de biofilme acumulado, por forma a que a nitrificação seja feita com eficiência máxima, já que uma camada fina de biofilme sobre o leito de biobolas favorece os microrganismos nitrificantes, enquanto uma espessa favoreceria as bactérias heterotróficas. A agitação contínua também garante ao leito um maior tempo de contacto aumentando a eficiência da nitrificação.

É importante ter em conta a escolha do tipo de biobolas usadas sendo que a área de superfície oferecida dita a capacidade do biofiltro. Em geral é aceitável afirmar que biobolas de tamanho reduzido possuem uma maior área de superfície reduzindo assim o tamanho necessário para o tanque do biorreator. No entanto, não se pode assumir que maior área de superfície significará sempre um aumento da nitrificação (Hall et al., 2002; Pfeiffer & Wills, 2011).

Nas figuras 3.2 (adaptada de Pfeiffer & Wills, 2011) e figura 3.3 (adaptada de Rusten, Eikebrokk, Ulgenes, & Lygren, 2006) esquematiza-se o funcionamento de um biofiltro de leito móvel.

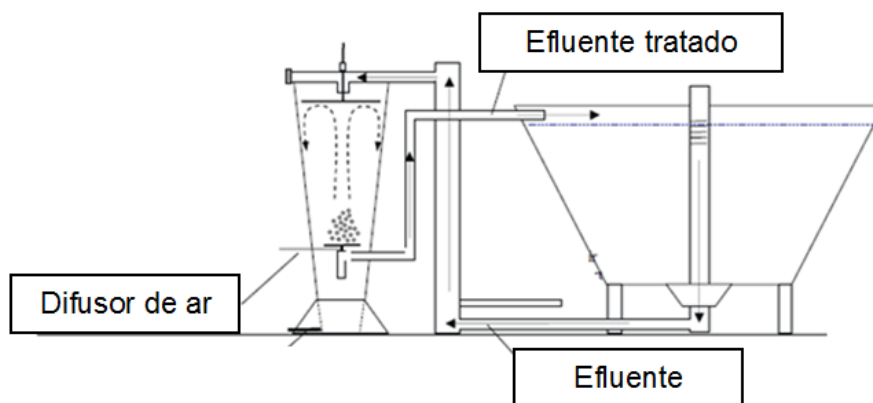


Figura 3.2 – Esquema de um biofiltro de leito móvel. (adaptada Pfeiffer & Wills, 2011)

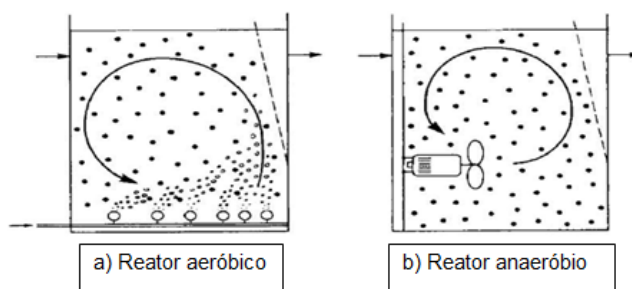


Figura 3.3 – Princípio dos reatores de leito móvel: a) aeróbio e b) anaeróbio (adaptada de Rusten, et al, 2006)

3.3.6 Biofiltros de leito fixo

Os biofiltros de leito fixo (*Fixed film bioreactors*), funcionam de forma semelhante aos de biofiltros de leito móvel apresentados, mas sem agitação. Estes biorreactores de leito fixo são mais estáveis que os de leito móvel, sendo os desperdícios dissolvidos ou coloidais transportados por difusão para o biofilme, que adere e que cobre as biobolas ou substratos alternativos. Em geral são utilizadas pedras, conchas, areia ou plástico como substrato de adsorção do biofilme.

A eficácia de remoção do biofiltro é determinada pela população de biofilme quimioautotrófico que realiza o processo de nitrificação (Zhang and Bishop, 1994).

Os tipos de biofiltros de leito fixo utilizados em pisciculturas estão agrupados na figura 3.4 que podem ser sumarizados em quatro blocos devido às suas características idênticas.

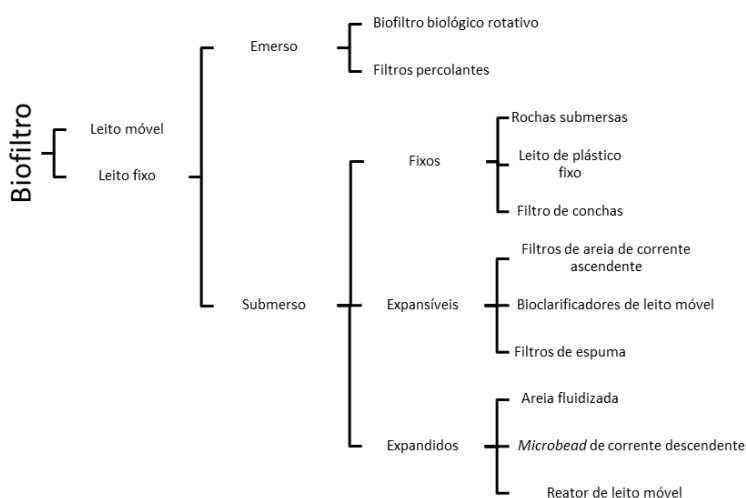


Figura 3.4 – Vários tipos de biofiltros de leito móvel (adaptado de Malone & Pfeiffer, 2006)

O esquema da Figura 3.4 e as Tabelas 3.1 e 3.2 permitem concluir que existe uma grande diversidade de opções em termos de tecnologias de tratamento de efluentes de piscicultura, baseadas na utilização de filtros biológicos que promovem um ou outro grupo de microrganismos em função dos objetivos específicos.

Tabela 3-1- Reatores de desnitrificação em diversos sistemas recirculantes de acordo com van Rijn et al.,

Sistemas de Água doce		
Reatores de desnitrificação	Organismo em cultura	Carbono/ Dador de electrões
Lamas ativadas	Carpa	Endógena
Lamas ativadas	Tilapia, enguia	Glucose/metanol
Lamas ativadas	Truta	Amido de milho hidrolisado
Digestão em bacia e Reator de leito fluidizado	Tilapia	Endógena
Lamas ativadas	Enguia	Endógena
Reator de leito fixo	?	Metanol
Reator de leito fixo	?	Endógena
Polímeros	Carpas decorativas	Endógena
Polímeros	Peixes decorativos	Polímeros biodegradáveis
Reator de leito fixo	Enguia	Metanol
Sistemas marinhos		
Reatores de desnitrificação	Organismo em cultura	Carbono/ Dador de eletrões
Reator de leito fixo	Salmão Rei e do Atlântico	Metanol
Reator de leito fixo	Linguado Japonês	Glucose
Reator de leito fixo	Lulas	Metanol
Reator de leito fixo	?	Etanol
Reator de leito fluidizado	Peixes decorativos	Metanol
Polímeros	?	Glucose
Reator de leito fixo	Peixes decorativos	Metanol
Reator de leito fixo	Camarões	Etanol/metanol
Polímeros	Peixes decorativos	Amido
Digestão em bacia de leito fluidizado	Pargos e Douradas	Endógena
Biorreator de leito móvel	Pargos e Douradas	Amido

(2006)

Na tabela 3.1 sumariza-se os tipos de reatores desnitrificantes utilizados em RAS aplicados a aquaculturas de diversas espécies piscícolas, enquanto nas Tabelas 3.2 e 3.3 se indica as taxas volumétricas de desnitrificação de diversos tipos de biorreatores (Tabelas adaptadas de van Rijn et al., 2006), respetivamente para a água doce e água salgada.

Tabela 3-2 - Rácios de desnitrificação por alguns reatores desnitrificantes em água doce (segundo van Rijn et al., 2006)

Sistemas de Água doce			
Reator desnitrificante	Meio	Fonte de Carbono	Rácio de remoção (mg NO ₃ -N/l/h)
Leito Fluidizado	Areia	Endógena	35,8
Leito fixo	Polímeros Biodegradáveis	PHB(C ₄ H ₆ O ₂) _n	7-14
Leito fixo	Polímeros Biodegradáveis	PCL(C ₆ H ₁₀ O ₂)	21-166
Leito fixo	Polímeros Biodegradáveis	Bionolle(C ₆ H ₈ O ₄) _n	1,5-77
Leito fixo	Polietileno	Metanol	1,8
Bacia de Digestão	Lama	Endógena	5,9
Leito fluidizado	Areia	Endógena	55,4
Leito fixo	Esferas de alginato liofilizadas	Amido	26,0
Bacia de Digestão	Lama	Endógena	1,5
Leito fluidizado	Areia	Endógena	43,3

Tabela 3-3 - Rácios de desnitrificação por alguns reatores desnitrificantes em água salgada (segundo van Rijnet al., 2006)

Sistemas Marinhos			
Reator desnitrificante	Meio	Fonte de Carbono	Rácio de remoção (mg NO ₃ -N/l/h)
Leito fixo	Meio de plástico	Glucose	1,7
Leito fixo	Granulado de tijolo	Etanol	100
Leito fixo	Meio poroso	Metanol	7,3-8,4
Leito fixo	Álcool polivinil	Glucose	1,4
Leito fixo	Bolas de plástico / conchas de ostra esmagadas	Etanol/metanol	6,6
Leito fixo	Esferas de alginato liofilizadas	Amido	2,6
Bacia de digestão	Lama	Endógena	2,5
Leito fluidizado	Areia	Endógena	72,6
Reator de leito móvel	Meio plástico	Endógena	24

3.3.7 Microalgas na remoção de nutrientes da água

Tradicionalmente, os sistemas de aquacultura em lagoas controlavam a acumulação de azoto através do cultivo simultâneo de microalgas (Ebeling et al. 2006). Apesar de atualmente a estratégia primária de tratamento, em sistemas de produção intensiva com recirculação da água, incluir sempre a utilização de sistemas de biorreatores com biofilmes de bactérias em leitos móveis (Ebeling et al. 2006), o excesso de matéria orgânica nos efluentes favorece as bactérias heterotróficas (cf. 3.3.5.) limitando a atividade das bactérias oxidantes de amónia e de nitritos. Assim, o uso de microalgas na remoção de nutrientes da água tem vindo a ganhar interesse nos últimos anos (Abdel-Raoufv et al., 2012), interesse que renasce também devido ao entendimento sobre a sua biologia e ecologia em culturas de algas de larga escala, bem como sobre os sistemas de cultura e os sistemas de recolha (Javanmardian and Palsson, 1991).

Estes sistemas de tratamento baseiam-se em biofiltros/biorreactores. O tratamento biológico por microalgas torna-se bastante prático já que as suas capacidades fotossintéticas, permitem a acumulação de biomassa, incorporando nutrientes como azoto e fósforo. Além disso, estes sistemas de tratamento permitem gerar, a partir das algas, produtos de grande valor económico tais como substâncias de interesse farmacêutico ou biotecnológico como o biodiesel, entre outros (Haroun et al., 1995).

Algas como as do género *Scenedesmus* têm potencial para tratar efluentes e ao mesmo tempo gerar uma fonte de baixo custo de lípidos para produção de biodiesel (Girisha et al., 2014).

Atualmente tenta-se criar alternativas para o cultivo de microalgas, explorando o aumento da área de superfície da água de forma a ter mais luz disponível para o crescimento das algas. Estão a ser exploradas soluções como as apresentadas a título de curiosidade na figura 3.5.



*Figura 3.5 – Alternativas de reatores de criação algas: bacias, tubulares horizontais/verticais e “colchões”
(<http://www.transnatural.nl/data/images/algaeparc.jpg>)*

4 Características da instalação da Caviar Portugal

A Caviar Portugal nasceu em 2012, focada no desenvolvimento e implementação de uma aquacultura de esturjão para produção de caviar. A empresa tem vindo a valorizar o desenvolvimento sustentável através de um projeto que se baseia nas relações entre a energia renovável, a hidroponia e a tecnologia de ponta de sistemas multitróficos recirculantes da água (RAS- “*Recirculating aquaculture systems*”).

4.1 Breve descrição do processo de produção

O processo de produção atual da Caviar Portugal encontra-se esquematizado na figura 4.1. Brevemente haverá uma expansão das instalações, durante a qual o sistema RAS passará a recircular $70 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$, pretendendo-se que apenas 7 a $10 \text{ m}^3\text{dia}^{-1}$ tenham de ser descartados como efluente. A minimização do volume de efluente envolverá a adição de mais um passo na remoção biológica ao sistema RAS (ilustrado a azul na figura 4.2, que poderá eventualmente vir a ser integrado no ciclo de vida do esturjão através dos reatores ilustrados a vermelho na figura 4.2).

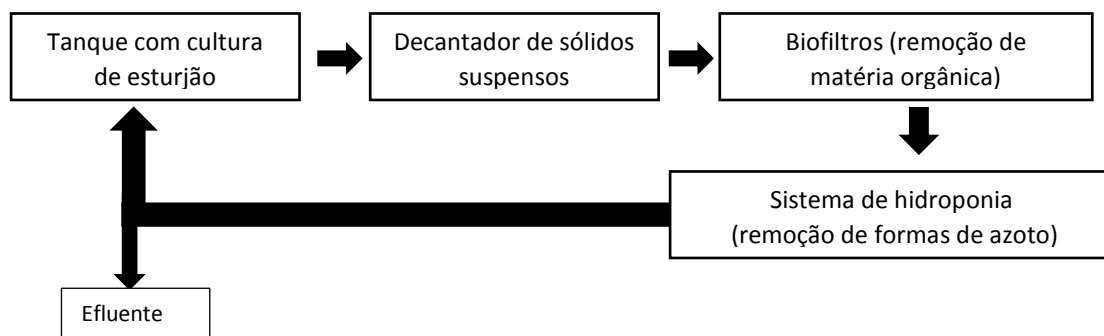


Figura 4.1 – Atual sistema RAS da Caviar

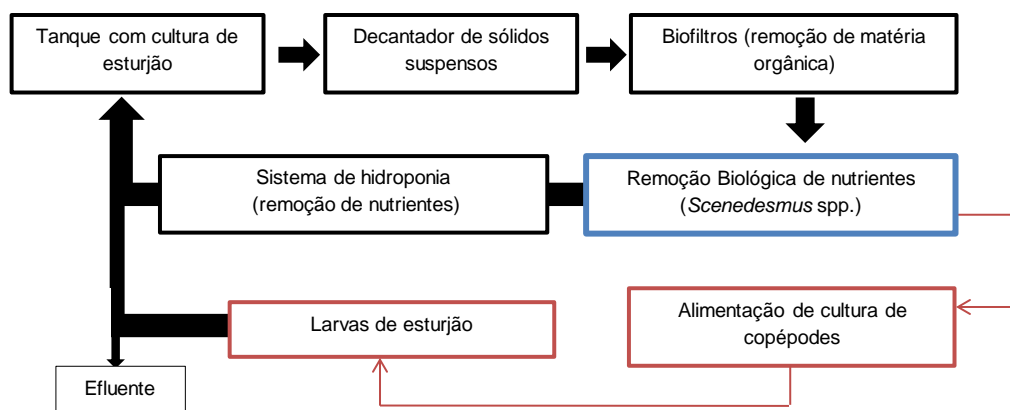


Figura 4.2 - Potencial futuro sistema RAS de produção da Caviar Portugal

4.2 Características do efluente da Caviar Portugal

Na tabela 4.1 estão indicados valores médios dos parâmetros químicos do efluente da Caviar Portugal no período de 19-04-2016 a 02-06-2016.

Tabela 4-1 - Parâmetros típicos do efluente bruto da Caviar Portugal, período 19-04-2016 a 02-06-2016

	Concentração	Unidade
pH	7,29 +/- 0,18	-
Condutividade	365,33 +/- 49,79	(μ S/cm)
ORP	271,2 +/- 33,04	(mV)
Turbidez	1,31 +/- 0,8	(NTU)
NH ₄	0,61 +/- 0,22	μ mol/L
NO ₃	1436,17 +/- 340,22	μ mol/L
NO ₂	5,79 +/- 2,68	μ mol/L
N total	4851,93 +/- 1123,09	μ mol/L
PO ₄	11,78 +/- 3,62	μ mol/L
P total	15,70 +/- 3,5	μ mol/L
CBO	6,13 +/- 1,60	mg/L O ₂
CQO	27,92 +/- 3,38	mg/L O ₂

Este efluente é rico em nutrientes azotados onde o nitrato é o que merece maior atenção devido à sua grande concentração. Os valores típicos do efluente da Caviar Portugal encontram-se de acordo com a legislação em vigor (tabela 4.2), à exceção do NO₃ e consequentemente do N total.

Tabela 4-2 – Valores limite de emissão, na descarga de águas residuais, Decreto-Lei n.º 236/98, ANEXO XVIII

Parâmetros	VLE (valor limite de emissão)	
Temperatura da água	> 3º C	
pH	6 - 9	
Nitritos, NO ₂ -N	-	
Nitratos, NO ₃ -N	807 µmol/L	11,3 mg/L (NO ₃ - N), 50 mg/L (NO ₃ ⁻)
P total	323 µmol/L	10 mg/L
N total	1071 µmol/L	15 mg/L

Comparando os valores típicos à saída do efluente com os valores recomendados para a criação de esturção em sistemas RAS (tabela 4.3), verifica-se que na maioria dos parâmetros, o efluente possui qualidade suficiente para ser recirculado, com exceção dos valores para NO₂ e NO₃.

Tabela 4-3 - Parâmetros hidroquímicos da entrada de água doce e de água reciclada em módulos com RAS. (Caviar Portugal, 2016)

Parâmetros	Unidades	Requisitos de qualidade para a água reciclada na unidade de criação
Temperatura da água	ºC	22-25
Oxigénio dissolvido, O ₂	mg/L	6 -12
pH	pH	6,8-8,2
Cloretos (Cl ⁻)	mg/L	< 10
Dióxido de Carbono, CO ₂	mg/L	< 10
Amónia livre, NH ₃	µmol/L	< 2,9
Azoto amoniacal, NH ₄ -N	µmol/L	< 27,8
Nitritos, NO ₂ -N	µmol/L	1,6 - 3,2
Nitratos, NO ₃ -N	µmol/L	326,1 - 434,8
Fosfatos, PO ₄ -P	µmol/L	2,1 - 5,3
CQO (oxidação por dicromato)	mg O ₂ /L	20-60
Oxidabilidade ao permanganato, KMnO ₄	mg O ₂ /L	10-15
Sólidos Suspensos Totais	mg/L	<10

Na Caviar Portugal pretende-se recircular 90% da água e gerar um efluente com 7 a 10m³d⁻¹ de caudal. A qualidade deste efluente terá no mínimo de cumprir com o disposto na lei relativa às emissões para o ambiente (tabela 4.2).

Tendo em conta os potenciais efeitos de diferentes relações entre a razão C:N evidenciados na figura 4.3, prevê-se que a efetiva remoção de nutrientes

azotados e fosfatados só possa ter lugar após o primeiro biofiltro da Caviar Portugal. Este reduzirá a razão C:N do efluente, reduzindo a vantagem competitiva das bactérias heterotróficas sobre as bactérias nitrificantes, aumentando a potencial remoção de azoto inorgânico (Strauss & Lamberti 2000).

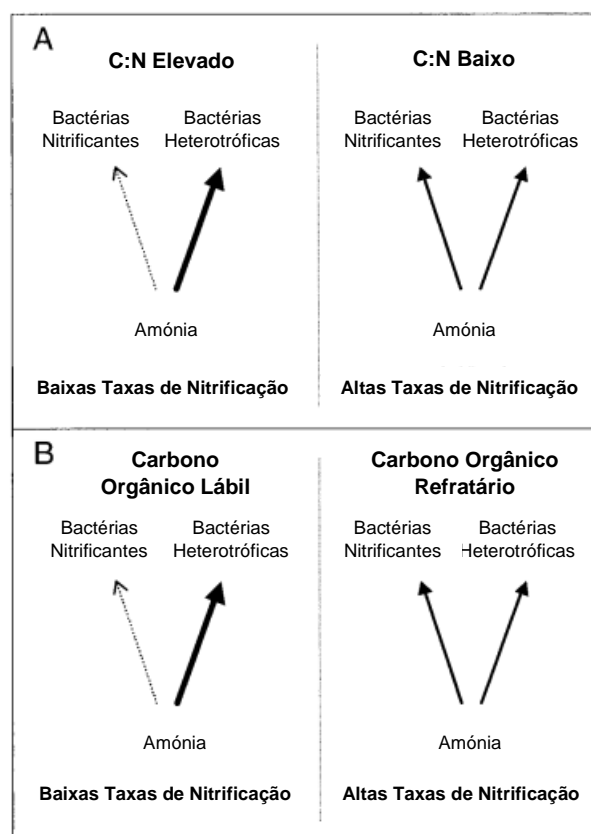


Figura 4.3 – Relação entre a razão C:N e competitividade microbiana nitrificante (figura adaptada de Strauss & Lamberti 2000).

5 Trabalho experimental e obtenção de variáveis

5.1 Material e métodos

O trabalho experimental delineado teve como objetivo global adquirir valores para as variáveis necessárias ao delineamento de um sistema de filtro biológico com microalgas para remoção de nutrientes, a incluir numa das fases do sistema de tratamento da Caviar Portugal de modo a que todo o sistema se possa comportar como um sistema integrado de aquacultura com recirculação de água (RAS).

Para tanto teve-se em conta os resultados obtidos em 2015 pelos alunos da disciplina de Limnologia da FCT que, ao elaborarem uma atividade experimental para testar vários tipos de tratamento do efluente da Caviar Portugal, obtiveram os melhores resultados de remoção de nutrientes através de um *bloom* fortuito de microalgas, que se desenvolveu no tanque destinado à avaliação da atenuação natural.

De facto, como se referiu em 3.3.7, tradicionalmente os sistemas de aquacultura em lagoas controlavam a acumulação de azoto através do cultivo simultâneo de microalgas (Ebeling et al. 2006).

5.1.1 Material biológico

Como material biológico selecionou-se culturas de algas maioritariamente dominadas por espécies do género *Scenedesmus* Meyen, 1829. A seleção de espécies deste género justifica-se pela sua anterior utilização em outros trabalhos com objetivos semelhantes e pela possibilidade da sua valorização através da extração de outros produtos como lípidos, Girisha et al., 2014, Xin, Hong-ying, Ke, et al. 2010.

As culturas foram mantidas com arejamento fornecido por compressores de aquário, em garrações de água de 5 L, em que 5 L de água da torneira foram previamente desinfetados com 6 mL de lixívia durante 48 horas, ao fim dos quais se adicionaram os nutrientes de modo a obter uma concentração final igual à do meio de cultura F2 (Guillard, 1975), figura 9.1 em anexo.

Designou-se por *Inóculo X* a estirpe de *Scenedesmus* (*Figura 5.1*) proveniente de culturas de microalgas dulciaquícolas mantidas há vários anos no Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos (LEOA) do *campus* Gambelas da Universidade.

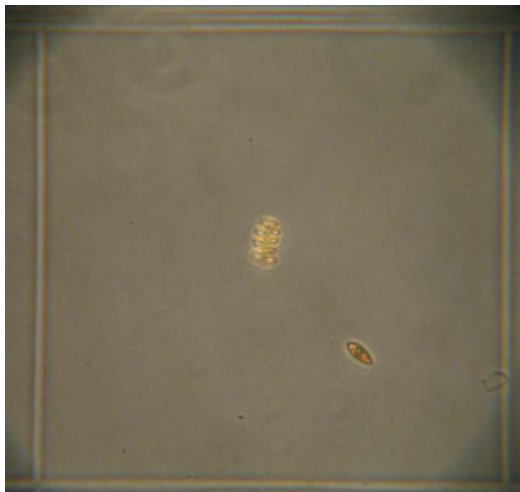


Figura 5.1 Imagem em microscopia ótica de contraste de fase (Leitz, Laborlux K, condensador ACHROPLAN) de uma amostra do Inóculo X em câmara de Neubauer, fixada com solução de Lugol em que se verifica a dominância por Scenedesmus sp.

Na terceira experiência usou-se também um isolado de *Scenedesmus* sp. obtido a partir de uma amostra ambiental realizada no Rio Ardila, no dia 18 de setembro de 2015, que sendo uma espécie mais rústica se revelou mais resistente a variações de luz, temperatura e pH, e que se passou a designar por *Inóculo Y* (*figura 5.2*).

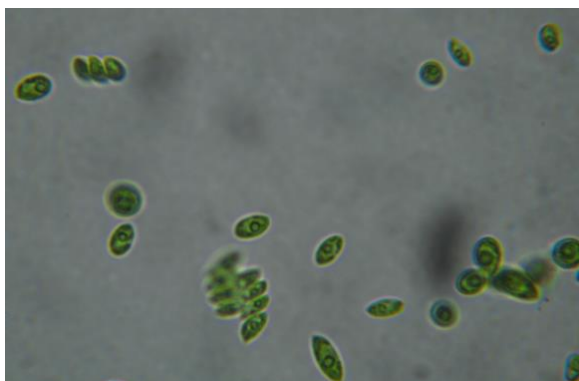


Figura 5.2 - Imagem em microscopia de campo claro de uma amostra in vivo Inóculo Y maioritariamente dominado por Scenedesmus sp.

5.1.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental envolveu uma sucessão de três experiências com objetivos encadeados de modo a permitir usar os resultados na secção 6, dedicada ao dimensionamento de um biorreator de leito móvel inoculado com culturas de *Scenedesmus* sp..

5.1.3 Experiência nº 1

A experiência nº 1 decorreu no período entre 02-10-2015 e 09-10-2015 e teve como objetivo geral, avaliar a potencial presença no efluente de inibidores do crescimento das microalgas.

O desenho experimental envolveu a montagem de microcosmos simuladores de um sistema de lagunagem onde se montaram diferentes situações, variando o tratamento prévio da água de efluente utilizada, nomeadamente sem tratamento prévio Água do efluente do biofiltro (AEB), a mesma mas previamente esterilizada em autoclave - Água do efluente do biofiltro esterilizada (AEE) e, finalmente água do efluente do biofiltro, previamente envelhecida no escuro durante 90 dias, para total remineralização e autoclavada (AEEE).

Pretendeu-se, assim, avaliar se AEEE permitia melhores crescimentos, por ter sido submetida à total destruição de qualquer inibidor orgânico, ou se a eliminação por esterilização da AEE eliminava a competição por nutrientes de outros microrganismos, que pudessem vir a pôr em causa a eficácia do biofiltro.

O sistema experimental consistiu em microcosmos simuladores de 5 situações:

- i. Atenuação natural com AEB + arejamento (1 replicado);
- ii. Controle da competição com AEE + arejamento (1 replicado);
- iii. Controle de inibidores químicos com AEEE + arejamento (1 replicado);
- iv. Crescimento no efluente com AEB + inóculo X + arejamento (3 replicados);
- v. Controle de inibidores com AEEE + inóculo X+ arejamento (3 replicados).

Cada replicado iv e v foi preparado em vasos de plástico como os da figura 5.3, nos casos de atenuação natural, usaram-se garrações de 5 L em

polietileno (PET), e cobriram-se as laterais com papel de alumínio para garantir uma exposição de luz idêntica à dos vasos (por serem opacos). Em cada caso o volume total foi de 3 L. Sendo que iv e v continham 2,75 L de AEB ou AEEE e 0,250 L de inóculo X. A experiência foi realizada em condições controladas no fitoclima existente na sala 0.5 do edifício 7 do Campus Gambelas.

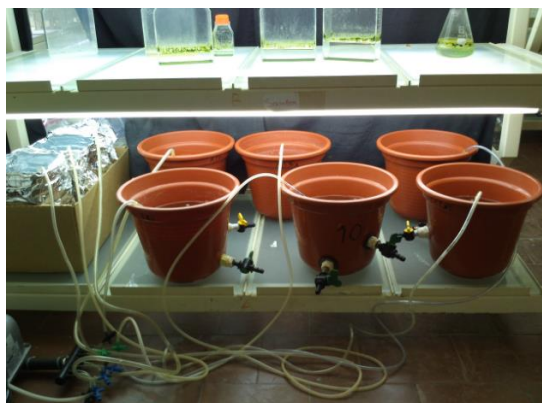


Figura 5.3 – Foto da experiência nº 1, (i) Brancos à esquerda (garrafas forradas com folha de alumínio) (ii, iii) Replicados das diferentes situações à direita (vasos).

Neste fitoclima manteve-se um fotoperíodo diário de 16 horas luz e intensidade média de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ a uma temperatura constante de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Recolheram-se amostras nos dias 2, 5 e 9 de Outubro de 2015 e analisaram-se diferentes parâmetros, como indica a Tabela 5.1, no laboratório de análises químicas (LAQ) da universidade do Algarve.

Tabela 5-1 - Tabela de parâmetros laboratoriais da experiência nº 1

Parâmetros	Sigla	Método de análise*	Equipamento	LQ	LD	Unidades
Nitritos	NO_2^-	Espectrofotometria SMEWW4500 – NO2-B	Spectroquant Pharo 300 - Merck	0,13	0,05	$\mu\text{mol/L}$
Nitratos	NO_3^-	Espectrofotometria SMEWW4500 – NO3-E	Spectroquant Pharo 300 - Merck	0,06	0,04	$\mu\text{mol/L}$
Amónia	NH_4^+	Espectrofotometria SMEWW 4500-NH4-G	Spectroquant Pharo 300 - Merck	0,344	0,214	$\mu\text{mol/L}$
Fosfatos	PO_4^{3-}	Espectrofotometria SMEWW-P-F	Spectroquant Pharo 300 - Merck	0,272	0,099	$\mu\text{mol/L}$

* SMEWW - “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, 21st Edition.

LQ – limite de quantificação

LD – limite de deteção

5.1.4 Experiência nº 2

A segunda experiência teve como objetivo avaliar a remoção de nutrientes da água de efluente de um biofiltro de uma aquacultura de esturjão por diferentes tipos de substratos para biofiltros.

Para tal foram montados, entre 12 e 26 de outubro de 2015, diferentes microcosmos simuladores de sistemas de lagunagem, para comparar a eficiência de remoção de nutrientes das algas X, com a obtida com rolhas de cortiça, tal como preconizado por autores como Soares et al. (2010).

Partindo dos resultados da experiência anterior, montou-se um sistema com maior número de replicados (4), em garrações com arejamento como se ilustra na figura 5.4.



Figura 5.4 – Foto da experiência nº 2, à esquerda os replicados das diferentes situações com Alga X (ii, iii), ao meio, (iv) situação de rolhas de cortiça, à direita Brancos (i)

O desenho experimental envolveu as seguintes situações:

- i. Atenuação natural – AEB + arejamento (3 replicados);
- ii. Biofiltro algal - AEB + inóculo X + arejamento (4 replicados);
- iii. Controle de inibidores das algas - AEEE + inóculo X + arejamento (4 replicados);
- iv. Biofiltro de cortiça - AEB + cortiça + arejamento (4 replicados);

Cada replicado preparado em bases serradas de garrações de 5 L em polietileno (PET), continha em cada caso 3 L totais. Sendo que ii, iii continham 2,75 L de AEB e 0,250 L de inóculo X. Na situação iv encheu-se metade do volume do garrafão com rolhas de cortiça imersas de forma forçada, em de 3 L de AEB.

A experiência foi realizada em condições controladas no fitoclima existente na sala 0.5 do edifício 7 do Campus de Gambelas. Como na experiência anterior o fitoclima foi mantido com um fotoperíodo diário de 16 horas de luz e intensidade média de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ a uma temperatura constante de $25\pm 2^\circ\text{C}$.

A recolha de amostras foi feita a 12, 15, 19, 22 e 26 de Outubro e analisaram-se no laboratório de análises químicas (LAQ) da universidade do Algarve, diferentes parâmetros, como se indica na tabela 5.2.

Tabela 5-2 - Tabela de parâmetros laboratoriais da experiência nº 2

Parâmetros	Sigla	Método de análise*	Equipamento	LQ	LD	Unidades
Nitritos	NO_2^-	Espectrofotometria SMEWW4500 – NO2-B	<i>Spectroquant Pharo 300, Merck</i>	0,13	0,05	$\mu\text{mol/L}$
Nitratos	NO_3^-	Espectrofotometria SMEWW4500 – NH3-E	<i>Spectroquant Pharo 300, Merck</i>	0,06	0,04	$\mu\text{mol/L}$
Amónia	NH_4^+	Espectrofotometria SMEWW 4500- NH4-G	<i>Spectroquant Pharo 300, Merck</i>	0,344	0,214	$\mu\text{mol/L}$
Fosfatos	PO_4^{3-}	Espectrofotometria SMEWW-P-F	<i>Spectroquant Pharo 300, Merck</i>	0,272	0,099	$\mu\text{mol/L}$

* SMEWW - "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21st Edition.

LQ – limite de quantificação

LD – limite de deteção

5.1.5 Experiência nº 3

Esta experiência, que decorreu entre 11 e 21 de março de 2016, teve como objetivo comparar a eficácia de remoção de nutrientes da água de efluente do biofiltro por parte de duas variedades de alfaces ("verde e roxa") e de dois isolados diferentes do género *Scenedesmus*, denominados de X e Y.

O desenho experimental envolveu a montagem em Gambelas de microcosmos numa das estufas da universidade, onde irá funcionar a futura expansão da Caviar Portugal, tendo os diversos replicados, de cada situação, sido dispostos aleatoriamente (figura 5.5).



Figura 5.5 – Experiência nº 3, Brancos(i), Alga X(ii) e Y(iii), Alfices Verde (iv) e Roxa (v)

Montaram-se as seguintes situações:

- i. Atenuação natural – AEB + arejamento (3 replicados);
- ii. Biorreator de microalgas com inóculo X + AEB + arejamento (4 replicados);
- iii. Biorreator de microalgas com inóculo Y + AEB + arejamento (4 replicados);
- iv. Alfices verdes + AEB + arejamento (4 replicados);
- v. Alfices roxas + AEB + arejamento (4 replicados).

Cada replicado foi preparado em bases serradas de garrações de 5 L em polietileno (PET), contendo em cada caso 3 L de AEB. Nas situações ii e iii adicionaram-se 30 mL do inóculo de alga X ou Y, respetivamente. Nas situações iv e v foram dispostas 16 alfaces por replicado, suportadas por placas alveolares de esferovite, ficando a raiz em contacto com a água. Foram feitas marcas nos garrações indicadores do nível de água. Este nível foi mantido todos os dias e a evaporação foi medida com uma proveta de 1L, com o registo do volume de água repostos. O volume de água evaporada foi repostos com água destilada e esterilizada, todos os dias antes de feitas as recolhas, procedendo-se a homogeneização antes de cada amostragem.

Amostragem

Colheram-se amostras todos os dias (50 mL por replicado), exceto aos fins de semana, durante um período de 10 dias em tubos de 50 mL tipo Falcon estéreis. No 1º dia e no último da experiência colheram-se 50 mL adicionais por replicado para análise de fósforo total. Adicionalmente, recolheu-se diariamente 50 mL de cada replicado de algas X e Y, amostras que foram fixadas com solução de Lugol, para posterior contagem das células.

Análises químicas e determinações laboratoriais:

Na tabela 5.3 constam os parâmetros químicos determinados por métodos normalizados no Laboratório de Análises Químicas (LAQ) da UAlg, bem como os respetivos limites de quantificação e periodicidade de amostragem.

Tabela 5-3 – Parâmetros de análise laboratorial, método de análise, equipamento, Limites de quantificação e deteção, unidades e periodicidade de análise

Parâmetros	Sigla	Método de análise	Equipamento	LQ	LD	Unidades	Periodicidade de amostragem
Nitritos	NO ₂ ⁻	Espectrofotometria SMEWW4500 – NO2-B	<i>Spectroquant Pharo 300, Merck</i>	0,13	0,05	µmol/L	Diária
Nitratos	NO ₃ ⁻	Espectrofotometria SMEWW4500 – NH3-E	<i>Spectroquant Pharo 300 - Merck</i>	0,06	0,04	µmol/L	Diária
Amónia	NH ₄ ⁺	Espectrofotometria SMEWW 4500- NH4-G	<i>Spectroquant Pharo 300 - Merck</i>	0,344	0,214	µmol/L	Diária
Fosfatos	PO ₄ ³⁻	Espectrofotometria SMEWW-P-F	<i>Spectroquant Pharo 300 - Merck</i>	0,272	0,099	µmol/L	Diária
Fosforo Total	P	Digestão, Espectrofotometria SMEWW-P-F	<i>Spectroquant Pharo 300 - Merck</i>	0,272	0,099	µmol/L	Início e Fim

* SMEWW - "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 21st Edition.

LQ – limite de quantificação

LD – limite de deteção

Parâmetros de leitura direta:

Foram também monitorizados, ao longo de todo o processo, diversos parâmetros de leitura direta de acordo com a tabela 5.4.

Monitorizou-se a evaporação através da medida do nível da água com reposição diária e registo do volume evaporado. Por leitura direta com um termómetro, registou-se diariamente a temperatura.

Tabela 5-4 – Parâmetros registados, de leitura direta e climatéricos

Parâmetros	Sigla	Equipamento	Unidades	Periodicidade de amostragem
pH	pH	pH meter 507, Crison	-	Diária
Temperatura	temp.	Termómetro	°C	Diária
Radiação Solar	rad.	Estação meteorológica Campus Gambelas	W/m ²	Diária
Evaporação	evap.	Proveta 1L	mL	Diária
Humidade Relativa	humid	Estação meteorológica Campus Gambelas	%	Diária
Comprimento da folha das alfaces	comp.	Régua	cm	Início e Fim
Crescimento celular	-	Camara de Neubauer, microscópio de contraste de fase	nº de células/mL	Diária

Análises biométricas

A concentração de células X e Y foi determinada por contagem em câmara de Neubauer das células de *Scenedesmus* sp. observadas nas amostras preservadas com Lugol. Estas contagens permitiram determinar a taxa de crescimento das algas X e Y.

Para medição do crescimento das alfaces, foram marcadas as posições de cada alface, e marcou-se, com caneta de feltro, uma folha de cada alface medida no início da experiência. No fim da experiência tornou-se a medir, com uma régua, o comprimento e a largura das folhas marcadas, assim como o comprimento e largura da maior folha entretanto desenvolvida.

5.2 Resultados e discussão

As experiências 1 e 2 foram consideradas experiências piloto, tendo servido para testar varias hipóteses e otimizar a experiência nº 3. Esta por sua vez, foi a experiência que serviu para obtenção dos resultados mais relevantes e necessários para o dimensionamento do biorreator.

5.2.1 Experiência nº 1

Esta experiência teve como objetivo detetar se haveria algum efeito de inibição de crescimento das microalgas por parte do efluente da Caviar Portugal. Deste modo foi possível verificar que não existiu qualquer efeito de inibição no crescimento do inóculo X. Verificou-se o crescimento do inóculo X em ambas as situações testadas, AEB e AEEE. Em AEB, a microbiota presente no efluente não impediu o crescimento da alga e em AEEE verificou-se que os nutrientes presentes na água são suficientes para o cultivo e proliferação da mesma.

Ao longo dos 7 dias da experiência não se detetou qualquer crescimento algal nos brancos de controlo, designados por AEB0, AEE0 e AEEE0. Em contrapartida nos microcosmos inoculados não se observou qualquer diferença no crescimento entre os replicados de AEB e AEEE inoculados com a alga X.

Contrariamente ao esperado, ao longo do tempo parece ter havido aumento das concentrações dos nutrientes, o que só pode ser explicado pela elevada evaporação nas condições de arejamento e temperatura utilizadas.

No entanto, comparando para cada amostragem os valores obtidos para os brancos AEB0 e AEEE0 com os obtidos para os microcosmos inoculados AEB e AEEE, verifica-se que houve remoção de NO_3 em AEB e de NH_4 em AEEE (gráficos da figura 5.6).

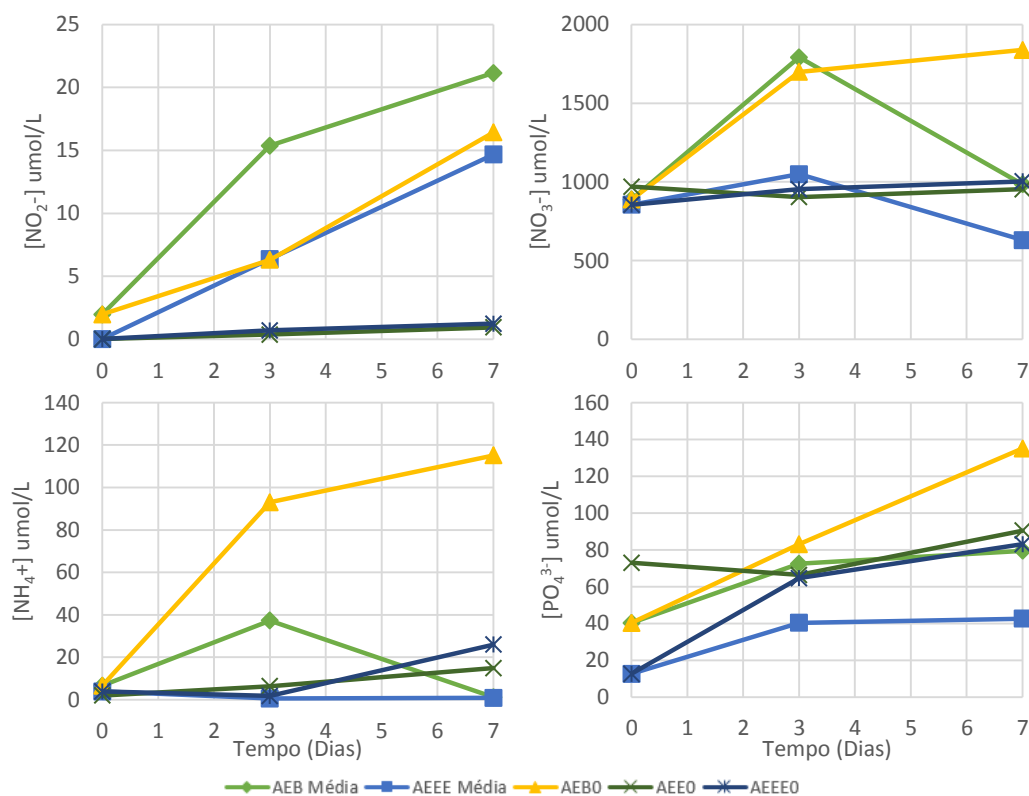


Figura 5.6 - Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ e PO_4^{3-} na experiência nº1

Quanto à remoção de NO_3^- em AEB verifica-se um pico de aumento de concentração ao 3º dia, tanto para AEB como para AEB0, esta concentração manteve-se elevada no controlo até ao ultimo dia experimental, no entanto na situação AEB é removido até valores idênticos à concentração inicial. Significando este resultado, que existiu uma remoção por parte da alga em AEB de cerca de 46% da concentração total de NO_3^- .

No caso da remoção de NH_4^+ por AEEE, verificou-se um aumento de concentração no controlo (AEEE0), devendo-se este resultado, possivelmente à evaporação, dado que as concentrações verificadas em AEEE se mantêm próximas de 0. Assumindo que a concentração provocada pela evaporação é idêntica tanto para o controlo como em AEEE, poder-se-á afirmar que terá ocorrido a remoção por parte de AEEE uma vez que o seu valor não sofreu alteração.

Determinou-se, para o sétimo dia, uma remoção da concentração total de NH_4^+ em AEEE de 96%, relativamente e ao seu branco. Parte desta amónia removida terá contribuído por oxidação para os elevados níveis de NO_2^- , bem

como para a reduzida eficiência de remoção de NO_3^- , que terá sido produzido e desnitrificado em concentrações equivalentes.

A ausência de remoção de formas de azoto com exceção da amónia., poderá também ter sido condicionada pelas condições experimentais, como a quantidade de luz disponível, sendo que os recipientes utilizados eram opacos. A quantidade de luz tem uma relação importante com a taxa de crescimento das microalgas (Wu et al. 2013). Por outro lado, a elevada evaporação num sistema mantido a 25 ± 2 °C deverá ter conduzido à concentração de sais inorgânicos eliminando qualquer hipótese de monitorização exata da remoção dos nutrientes.

A elevada variabilidade dos resultados por replicado levou a que se tentasse corrigir este aspeto nas experiências seguintes aumentando o número de replicados.

5.2.2 Experiência nº 2

Os gráficos, compilados na figura 5.7, representam o comportamento da média das concentrações dos diferentes nutrientes nos replicados de cada situação experimental.

Na situação i (branco), ao longo de toda a experiência, no que diz respeito à variação da concentração de NO_2^- , observou-se um aumento de 1,84 $\mu\text{mol/L}$ para 35,92 $\mu\text{mol/L}$. Nas situações ii (AEB + alga X) e iii (AEEE+ alga X) verificou-se um aumento na concentração de 2 para 5 $\mu\text{mol/L}$ até ao 3º dia, a partir do qual houve remoção de NO_2^- baixando a concentração final para 2 $\mu\text{mol/L}$ na situação ii e 5 $\mu\text{mol/L}$ para a situação iii.

Tal como na experiência 1, os resultados apresentados foram influenciados pelas condições de simulação e de análise. No caso das condições de simulação, existiu, novamente, uma grande evaporação de água não controlada ao longo da experiência.

Quanto aos métodos de análise utilizados, verificou-se que a cortiça terá libertado substâncias, que modificaram a cor da água, podendo estas, ter influenciado os valores obtidos por métodos fotométricos. Adicionalmente, a viabilidade do uso de cortiça em sistemas RAS poderá estar em causa, porque poderá inclusivamente, pôr em risco a vida dos peixes.

Relativamente à situação iv (AEB+cortiça) a concentração de NO_2^- aumentou até ao 7º dia para o valor de 26 $\mu\text{mol/L}$, diminuindo posteriormente para o valor final de 18,81 $\mu\text{mol/L}$. Foi possível então observar pela inclinação das retas que os picos de remoção para a situação ii e iii ocorreram entre o 3º e o 7º dia, ao passo que na situação iv esta ocorreu entre o 7º e o último dia.

Quanto às concentrações de NO_3^- , na situação i, observou-se um aumento ao longo de toda a experiência, cerca de 400 $\mu\text{mol/L}$, o que se atribui ao papel das bactérias nitrificantes que na ausência de competição com as microalgas puderam oxidar a amónia a nitrito e este a nitrato. Nas situações ii e iii houve redução da concentração de NO_3^- ao longo de toda a experiência, tendo esta, diminuído de 730 $\mu\text{mol/L}$ para 213 $\mu\text{mol/L}$ na situação iii e de 480 $\mu\text{mol/L}$ para 252 $\mu\text{mol/L}$ em ii, confirmando-se a utilização do nitrato pelas microalgas. Para a situação iv, verificou-se um aumento da concentração até ao 7º dia, salientando que a concentração final foi inferior à inicial, tendo ocorrido uma remoção de 364 $\mu\text{mol/L}$. Os picos de remoção ocorreram entre o 1º e o 3º dia para as situações ii e iii, e apenas a partir do 7º dia para a situação iv. O aumento inicial de NO_3^- poderá ter uma explicação semelhante à avançada para o controle, mas também se poderá dever à dissolução de compostos azotados presentes na cortiça promovida por ação das bactérias acompanhantes. A remoção a partir do 7º dia só pode ser explicada pelo desenvolvimento de biofilmes em anaerobiose na cortiça, que promoveram a desnitrificação quer assimilativa quer dissimilativa.

As concentrações de NH_4^+ para a situação i oscilaram ligeiramente ao longo do tempo experimental, no entanto a diferença entre o valor inicial e o final foi apenas de 2 $\mu\text{mol/L}$. Ou seja, toda a amónia produzida na degradação da matéria orgânica presente deverá ter sido consumida por bactérias nitrificantes. Nas situações ii e iii as concentrações iniciais foram relativamente mais baixas que nas restantes situações, em iii partindo de 0,92 $\mu\text{mol/L}$ para valores não detetáveis e em ii partindo de 1,26 $\mu\text{mol/L}$ para 0,52 $\mu\text{mol/L}$. Considerando que as microalgas (75%) preferem assimilar NO_3^- (Dortch, 1990) e que a maioria das bactérias (80%) consome preferencialmente NH_4^+ (Madigan et al. 2012), a amónia terá sido essencialmente removida pelas bactérias, quer por nitrificação, quer por assimilação. Neste caso é difícil

afirmar quando ocorreram os picos de remoção para as situações ii e iii visto os valores serem muito reduzidos, ainda assim, os gráficos apresentam um maior declive a partir do 7º dia para ambas as situações.

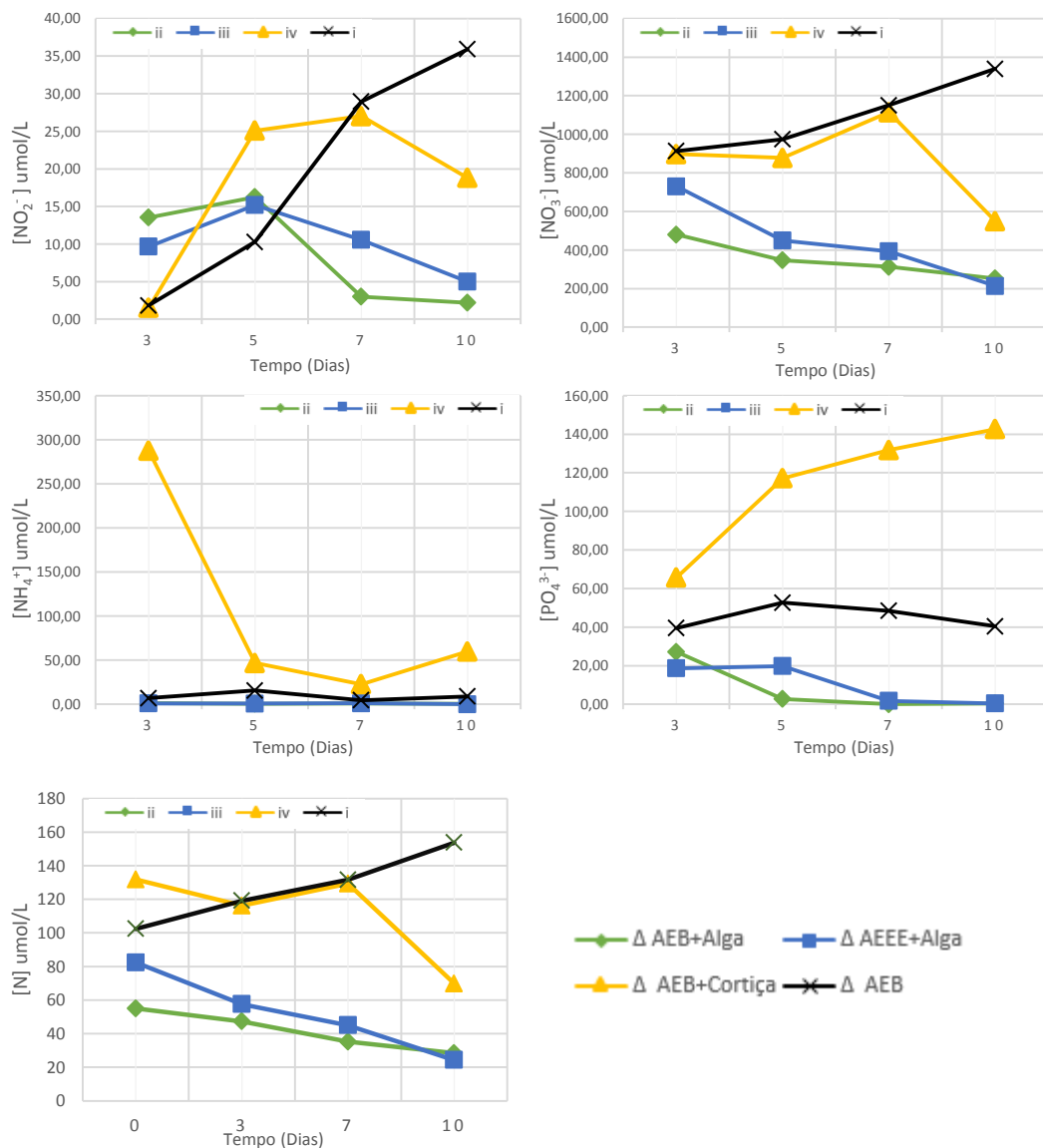


Figura 5.7 – Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} e N total na experiência nº2

Em iv os valores iniciais foram relativamente mais elevados que nas restantes situações, tendo uma concentração inicial de 287 $\mu\text{mol/L}$, possivelmente por dissolução de compostos presentes na cortiça. No entanto,

houve remoção de NH_4^+ até ao 7º dia, atingindo no final da atividade experimental um valor de 59,76 $\mu\text{mol/L}$.

Para as concentrações de PO_4^{3-} na situação i ocorreu uma ligeira oscilação ao longo da experiência, no entanto, o valor médio inicial e final é idêntico, aproximadamente 40 $\mu\text{mol/L}$. Em ii a concentração inicial foi de 27,20 $\mu\text{mol/L}$, baixando ao longo do tempo, atingindo valores não detetáveis, acabando com uma concentração final de 0,42 $\mu\text{mol/L}$. Na situação iii apenas ocorreu redução da concentração de fosfato a partir do 3º dia, no entanto a situação iii mostrou-se eficaz na remoção de PO_4^{3-} acabando com valores próximos de não detetáveis, passando de uma concentração inicial de 18,61 $\mu\text{mol/L}$ para uma concentração final 0,42 $\mu\text{mol/L}$. Na situação iv, não se registou qualquer tipo de remoção, tendo ocorrido um aumento de concentração ao longo do tempo de 65 $\mu\text{mol/L}$ para 142 $\mu\text{mol/L}$, sugerindo este resultado, que a cortiça poderá libertar grandes quantidades de fosfatos para a água. Nos restantes casos, os picos de remoção ocorreram na situação ii desde o início até ao 3º dia, e na situação iii a partir do 3º dia. Esta discrepância só se poderá dever à microbiota presente em AEB que foi totalmente removida em AEEE.

Em relação à remoção de N total, o comportamento é idêntico à verificada para NO_3^- . A elevada proporção de NO_3^- em relação aos restantes nutrientes, torna o nitrato o grande responsável pela remoção de azoto da água.

O aumento nas concentrações de nitrito no branco (i), poderá estar relacionado com a eficiência da microbiota nitrificante já que a energia livre de Gibbs associada à oxidação da amónia é mais negativa que a associada à oxidação do nitrito, desenvolvendo-se por isso as bactérias oxidantes da amónia mais rapidamente que as oxidantes do nitrito, o que conduz muitas vezes à acumulação de nitritos (Meyen, F.J.F., 1829). A evaporação poderá também ajudar a explicar o aumento de concentração nesta situação, bem como nas situações de ii e iii. Nestas últimas ocorreu assimilação ou oxidação de nitrito a partir do 3º dia. A situação iv, (cortiça) aparenta libertar nitrito para a água, no entanto este acaba por ser consumido a partir do 7º dia. Este período pode ser considerado a fase latente (*lag*) do período de colonização microbiana pelo que seriam necessários dias adicionais para verificar se existiria consumo total do nitrito.

A elevada remoção de azoto detetada, que variou entre 66% e 75% foi sobretudo atribuível à remoção de NO_3^- , remoção que prosseguiu apesar de as culturas se encontrarem totalmente limitadas em fósforo a partir do sétimo dia. De facto, o comportamento das concentrações de PO_4^{3-} , revela uma eficaz remoção pelas microalgas, uma manutenção praticamente constante na situação do branco com um ligeiro aumento talvez justificado pela evaporação. Na situação iv (cortiça) a concentração de fosfato aumentou ao longo de toda a experiência, facto que também inviabiliza o uso de cortiça como meio de remediação deste efluente.

5.2.3 Experiência nº 3

Os gráficos da figura 5.8 representam o comportamento das concentrações médias dos nutrientes analisados para as diferentes situações simuladas na experiência nº 3. Em anexo, encontra-se a tabela A-1 com os valores medidos *in situ* ao longo da experiência. A experiência foi realizada na estufa concessionada à Caviar Portugal, esperando-se que as condições reflitam o que se passará de futuro no mesmo espaço e na mesma altura do ano.

Variação das concentrações dos nutrientes ao longo do tempo

Relativamente a NO_2^- podemos observar que todas as situações (exceto o controlo) se mostraram eficazes na sua remoção sendo que no décimo dia foram atingidas concentrações próximas de zero. A concentração de NO_2^- desceu apenas 5 $\mu\text{mol/L}$ na atenuação natural relativamente à concentração inicial, provavelmente em função do crescimento lento das bactérias oxidadoras do nitrito. Em ambas as situações com as algas X e Y o comportamento da concentração de NO_2^- foi idêntico tendo sido removido praticamente na totalidade o nitrito inicial. Ambas atingiram o seu pico de remoção entre o 5º e o 7º dia. Relativamente à situação da alface verde, esta revelou-se a mais eficaz na remoção de NO_2^- da água, sendo que removeu uma maior quantidade de nitrito em menos tempo que as restantes situações e

atingiu o pico de remoção entre o 3º e o 4º dia. A situação com a alface roxa mostrou-se menos eficaz que a da alface verde no que toca à remoção de NO_2^- , ainda assim, mais eficaz que as situações com as algas X e Y. Ainda no cultivo da alface roxa, a eficiência de remoção de NO_2^- atingiu o máximo entre 3º e o 4º dia. Verificou-se pois que, na remoção de NO_2^- , as alfaces superam as culturas com as microalgas.

Quanto à variação das concentrações de NO_3^- , todas as situações se mostraram novamente eficazes na sua remoção dentro do tempo da atividade experimental. Ao fim dos 10 dias a água sem tratamento perdeu cerca de 400 $\mu\text{mol/L}$ de NO_3^- em relação à concentração inicial, o que se explica pela assimilação por parte da microbiota presente. No que diz respeito ao comportamento das algas, ambas apresentaram um comportamento idêntico tendo valores de concentração e remoção idênticos ao longo de toda a experiência. A maior taxa de remoção registou-se entre o 5º e o 6º dia com remoção praticamente total do NO_3^- existente na água. Relativamente às alfaces, a alface verde obteve novamente um melhor desempenho que as restantes situações, esta removeu NO_3^- mais eficientemente. A “alface verde” teve o seu pico de remoção entre o 1º e o 3º dia e foi a situação que removeu a totalidade de NO_3^- presente na água em menos tempo, sendo que ao 7º dia os valores de NO_3^- se encontravam próximos de zero ou não detetáveis. A situação com a alface roxa foi também mais eficiente na remoção de NO_3^- que as situações com algas, no entanto menos eficiente que a alface verde. A alface roxa atingiu o seu pico de remoção entre o 4º e o 5º dia, o total de remoção foi idêntico à situação das algas ao fim do 7º dia.

O comportamento relativamente às concentrações de NH_4^+ foi idêntico em todas as situações simuladas. Quanto ao comportamento da situação de atenuação natural, podemos ver que a concentração de NH_4^+ aumentou inicialmente cerca de 5 $\mu\text{mol/L}$ nos primeiros 3 dias, tendo diminuindo até aos 7,8 $\mu\text{mol/L}$ ao longo da experiência, de notar um grande pico na concentração no 5º dia, no entanto também se pode ver que o desvio padrão é igualmente bastante elevado. A explicação para esta variação de NH_4^+ no branco será semelhante à adiantada para a experiência nº 2. Quanto às situações simuladas, verificou-se que as situações das alfaces começaram com uma concentração ligeiramente mais elevada que as das algas X e Y, mas o

comportamento foi a partir daí semelhante. Ao fim do 4º dia, já se registaram valores de NH_4^+ próximos de zero em todas as situações testadas.

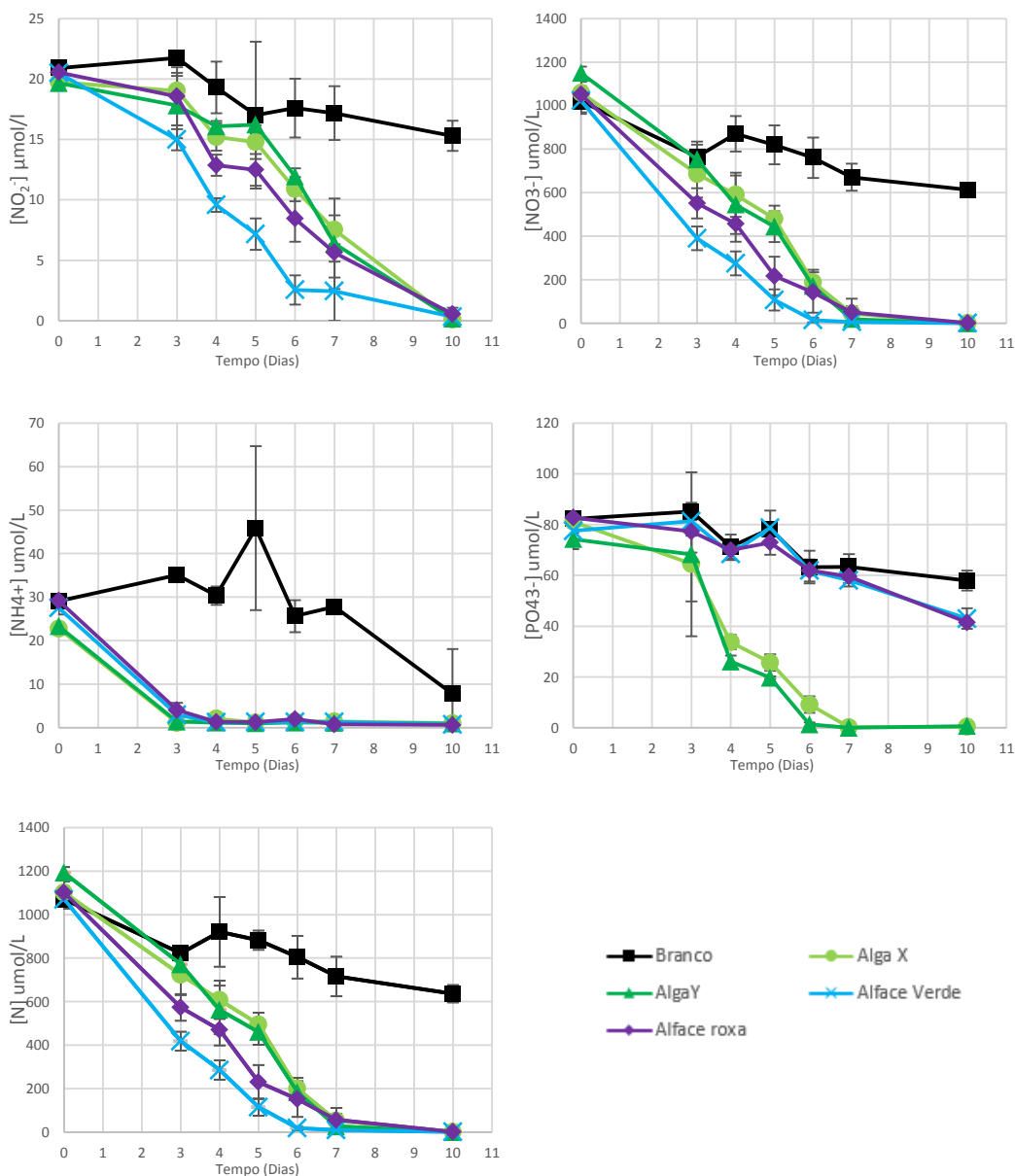


Figura 5.8 – Gráficos da variação da concentração dos nutrientes NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} e N total na experiência nº 3

O comportamento das concentrações de PO_4^{3-} mostrou um perfil de variação idêntico entre a atenuação natural e as situações com as alfices, pelo que não se pode afirmar que tenha havido remoção de fósforo pelas alfices. Nos casos das algas, observou-se a remoção do fósforo da água, sendo que o seu pico de remoção foi entre o 3º e o 4º dia. Notou-se também que a alga Y esgotou o PO_4^{3-} ao 6º dia, um dia antes da alga X.

A variação da quantidade de azoto inorgânico N total (DIN – dissolved inorganic nitrogen) presente na água, foi semelhante à da concentração de NO₃⁻ que foi a forma iónica responsável pela maior parte de Azoto presente na água.

Crescimento das Algas X e Y

Observando o gráfico da figura 5.9 que representa a variação das concentrações das células de *Scenedesmus* sp. verifica-se que a alga Y teve um maior crescimento que a alga X. Também se observa que a alga X parou de crescer a partir do 7º dia, enquanto a alga Y não completou a curva típica de crescimento não atingindo a fase estacionária. A alga X atingiu um máximo de densidade de $7,78 \times 10^5$ células/mL e a alga Y chegou às $2,35 \times 10^6$ células/mL.

A alga X parou de crescer ao 7º dia, enquanto a alga Y não atingiu a fase estacionária, pelo que seriam necessários mais dias de atividade experimental para se registar este fenómeno. O desempenho na remoção de nutrientes da alga Y, apesar da sua maior densidade, foi idêntico ao da alga X para as diferentes formas de azoto (figura 5.10). A grande discrepância de valores, indicada pelo grande desvio padrão dever-se-á possivelmente à má homogeneização da amostra na précontagem.

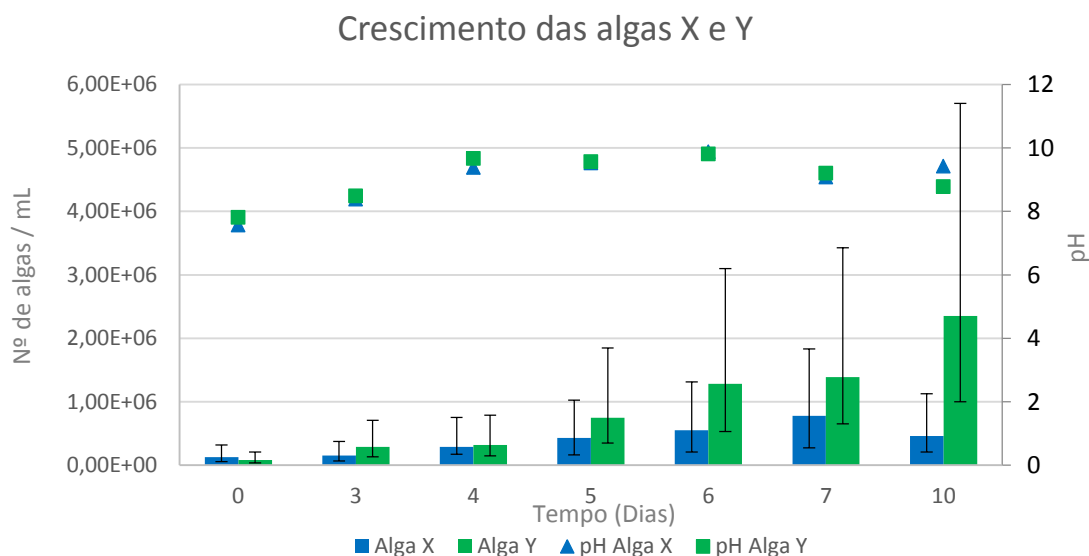


Figura 5.9 – Crescimento das situações com Alga X, Y e pH

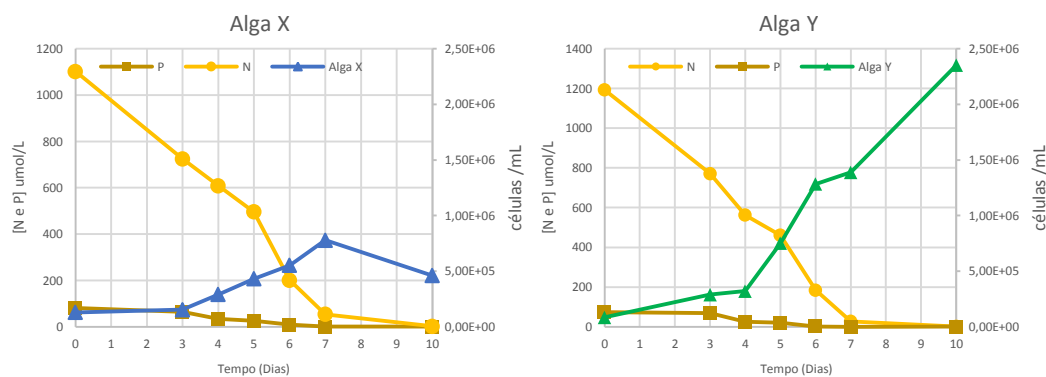


Figura 5.10 – Gráficos do crescimento das Algas X e Y em comparação com a remoção de N total e P total

Resultados biométricos das alfaces

O crescimento das alfaces foi medido no início e no fim da experiência, o que não se considera ter sido a melhor metodologia a ser utilizada. Um procedimento melhor, teria sido ter pesado as alfaces no início e no fim da experiência, uma vez que a técnica usada da folha marcada, não se revelou muito confiável. No início da experiência escolheu-se a maior folha que foi marcada, mas no final da experiência reparou-se que existiam folhas maiores que a folha marcada. Dito isto, os dados de crescimento relativamente às alfaces devem ser abordados com uma certa cautela.

Ainda assim registou-se que as alfaces roxas apresentaram no final da experiência folhas mais longas, no entanto mais finas, e “recortadas”. As alfaces verdes possuíam folhas mais largas e menos longas e com maior área, por serem menos recortadas que as alfaces roxas.

Em termos de remoção as alfaces verdes tiveram melhor desempenho que as roxas em todos os sentidos estudados. Observando a tabela 5.5 registou-se um crescimento médio de 3,6 cm em comprimento da folha e 20,1 cm² em área da folha para a alface verde. Estes valores representam um aumento de 52% em comprimento e 57% em área. A Alface roxa obteve um crescimento de folha de 1,8 cm e 9,8 cm² em área de folha, representando um aumento de 21% em comprimento e 31% em área.

Tabela 5-5 – Medidas do crescimento das Alfaces Verde e Roxa.

	Alfaces Verde		Alfaces Roxa	
	Comp. Folha (cm)	Área Folha (cm ²)	Comp. Folha (cm)	Área Folha (cm ²)
11/03/2016	6,81+/- 0,60	34,85 +/- 5,11	8,41 +/- 0,99	32,01 +/- 1,07
21/03/2016	10,41+/- 1,12	54,94+/- 6,67	10,25 +/- 1,28	41,81 +/- 7,62
Crescimento	3,6 (52,8%)	20,1 (57,6%)	1,8 (21,8%)	9,80 (30,6%)

Os gráficos da figura 5.11 ilustram a remoção total de azoto pelas alfaces e a ausência de remoção de fosfato.

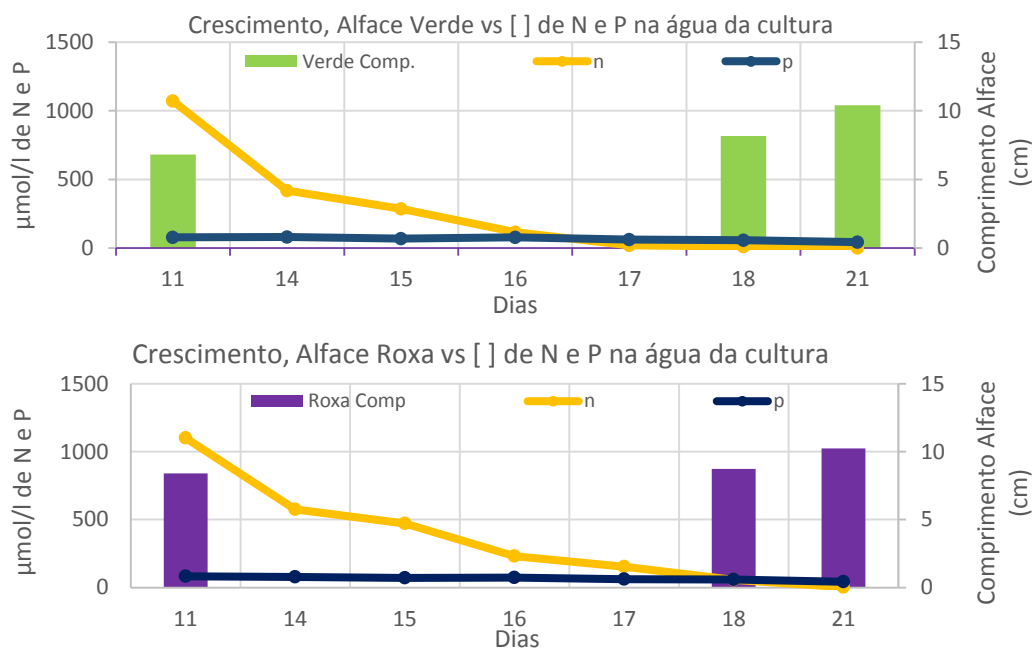


Figura 5.11 - Variação da concentração de N e P e crescimento das alfaces verde e roxa ao longo do tempo.

Remoção de nutrientes

Observando o comportamento dos nutrientes ao longo desta experiência verifica-se que tanto as algas como as alfaces se mostraram capazes da remoção da totalidade da concentração dos compostos azotados, mas apenas as algas foram capazes de remover eficazmente fosfato da água em tempo útil.

As algas consumiram equilibradamente os nitratos e os fosfatos para a sua biossíntese, enquanto as alfaces absorveram elevadas concentrações de nitratos, sem um correspondente aumento do consumo de fosfato. Assim, e apesar das alfaces verdes terem sido as mais eficientes na remoção de NO_2^- e NO_3^- da água e de atingirem os máximos de remoção mais rapidamente que as microalgas, estas apresentam a vantagem em relação às alfaces de removerem mais eficazmente os fosfatos. De facto, as microalgas revelaram serem capazes de esgotar o fósforo a partir do 6º dia para a alga Y e do 7º dia para a alga X. Este facto vai ser determinante no dimensionamento do sistema de tratamento em que as equações das taxas de crescimento dependem do substrato limitante.

As alfaces roxas não revelaram qualquer vantagem relativamente às verdes e só poderiam ser consideradas como alternativa num sistema de hidroponia, caso o seu valor de mercado venha a ser mais elevado.

Quanto à concentração de amónia, todas as situações esgotaram o NH_4^+ presente na água nos primeiros 3 dias, mantendo os valores próximos de 0 ao longo dos restantes dias, logo compatíveis com a recirculação da água num sistema RAS.

Quanto aos valores de NO_2 esperados para o efluente recirculante, os valores desejados (1,6 - 3,2 $\mu\text{mol/L}$, tabela 4.3) só foram atingidos a partir do décimo dia, isto significa que o sistema montado se mostrou pouco eficiente na remoção de nitrito e será necessário aumentar a concentração de oxigénio dissolvido a fim de facilitar a sua oxidação a NO_3^- (Ma et al. 2009).

Quanto aos objetivos para NO_3 são possíveis de atingir com a alface verde ao 3º dia, e entre o 5º e o 6º dia com as algas. Estes nº de dias vão ser indicadores dos tempos máximos de retenção do sistema de tratamento a dimensionar e do tempo inicial necessário para instalar as populações de microalgas.

Os objetivos de remoção de PO_4 foram atingidos ao 6º dia para a alga Y e ao 7º para a alga X.

6 Dimensionamento do Sistema de tratamento

6.1 Metodologia de Dimensionamento

Um biorreator passa pela criação das condições ideais de crescimento do microrganismo pretendido e para assegurar que os microrganismos podem crescer tem que garantir que eles se mantêm dentro do sistema tempo suficiente para que se possam reproduzir, período que depende da taxa de crescimento de cada organismo. Esta está diretamente relacionada com a velocidade a que eles metabolizam e utilizam o efluente. Assumindo que as condições ambientais de crescimento são controladas, um sistema de remoção eficiente pode ser garantido, controlando a taxa de crescimento dos microrganismos (Metcalf & Eddy 1995). Num biorreator de microalgas dever-se-á controlar a taxa de crescimento destas.

Taxa de crescimento microbiológico:

Assumindo que numa cultura de microalgas em condições de crescimento equilibrado, a taxa de aumento na população é proporcional à densidade populacional (Wanda F. 1998).

Então:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

Onde:

μ = Taxa de crescimento específico (t^{-1})

x = Densidade populacional (nº de células)

t = Tempo

Integrando obtemos:

$$x_t = x_0 \times e^{\mu t} \quad (2)$$

Onde: x_0 e x_t representam os valores de densidade populacional das microalgas nos tempos 0 e t .

A expressão (2) traduz o carácter exponencial do crescimento microbiano que por sua vez é equivalente a (3):

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

Taxa de crescimento em substrato limitante:

Numa cultura de microalgas, sem limitações de luz ou temperatura, se uma das outras condições necessárias para o seu crescimento (nutrientes ou substrato) se encontrar limitada, o crescimento cessa logo que o primeiro nutriente necessário se esgotar. Enquanto este não se esgota, o crescimento será inversamente proporcional ao substrato consumido.

A equação de Monod (Monod, J. 1949), traduz o efeito do substrato ou nutriente limitante da seguinte forma (4):

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (4)$$

Onde:

μ = Taxa de crescimento específico (t^{-1})

μ_{max} = Taxa de crescimento específico máxima (t^{-1})

S = Concentração do substrato limitante (mg/L)

K_s = Constante de Monod equivalente à concentração do substrato que permite o crescimento com uma taxa específica igual a metade da taxa máxima " $\mu_{max}/2$ " (mg/L).

Efeitos do metabolismo endógeno.

Em teoria, o consumo do substrato serve em parte para o crescimento da biomassa, enquanto outra parte serve para a manutenção da mesma. Este consumo é chamado de decaimento endógeno e pode ser traduzido pela seguinte equação (5) (Metcalf & Eddy 1995):

$$r_d(\text{decaimento endógeno}) = -k_d X \quad (5)$$

Onde:

k_d = coeficiente de decaimento endógeno (t^{-1})

X = concentração de células (massa/Vol.)

Ao obter esta equação podemos combiná-la com a equação (4) ficando a expressão (Metcalf & Eddy 1995):

$$r'_g = \frac{\mu_{max}XS}{K_s + S} - k_dX \quad (6)$$

Onde:

r'_g = rácio de crescimento bacteriano (massa/Vol. t)

Então a expressão (7) correspondente ao rácio de crescimento líquido (Van Uden, 1967):

$$\mu' = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} - k_d \quad (7)$$

Onde:

μ' = taxa de crescimento líquido (t^{-1})

Aplicação das equações de crescimento em substrato limitante ao tratamento biológico.

O processo de operação de um biorreator é sempre um balanço de massas entre os microrganismos e o substrato. Para tal em (8) e na Fig. 6.1 ilustra-se o que se passa num biorreator. De modo simplificado o processo pode ser representado por (9).

Considerando que o número de células é de acordo com a equação de Monod proporcional ao substrato limitante consumido, o valor de $r'g$ pode ser substituído na equação (10), obtendo (Metcalf & Eddy 1995):

$$\frac{dX}{dt}V_r = QX_0 - QX + V_r \left(\frac{\mu_{max}XS}{K_s + S} \right) - k_d X \quad (11)$$

Onde:

S = concentração no efluente do reator, mg/L

Assumindo que a concentração de microalgas que entra no reator deve ser desprezável, teremos $X_0=0$. Além disso num biorreator em equilíbrio $dX/dt = 0$. Assim, podemos considerar que a equação (11) pode ser simplificada para a seguinte expressão que nos dá o tempo de retenção hidráulica (12).

Volume do reator e Tempo de retenção hidráulico (Metcalf & Eddy 1995):

$$\frac{Q}{V_r} = \frac{1}{\theta} = \frac{\mu_{max} \times S}{K_s + S} - k_d \quad (12)$$

Onde:

Q= Caudal à entrada e saída (Vol./t)

V_r = Volume do reator

θ = Tempo de retenção hidráulico (t)

K_d = coeficiente de decaimento endógeno (massa/Vol.)

Na equação (12) o termo $1/\theta$ corresponde à taxa específica de crescimento líquido (7), que também corresponde a $1/\theta_c$, onde θ_c corresponde à média do tempo de residência das células. Num reator biológico θ_c pode ser definido como a massa de organismos que no reator dividido pela massa de organismos que é removida diariamente, deste modo θ_c pode ser dado pela expressão (13) (Metcalf & Eddy 1995):

$$\theta_c = \frac{V_r X}{QX} = \frac{V_r}{Q} \quad (13)$$

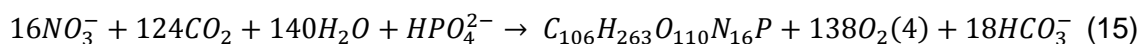
De acordo com o que foi dito anteriormente podemos afirmar que o tempo de retenção depende diretamente do Caudal e do Volume do reator. O tempo de retenção deve ser escolhido de acordo com as taxas ideais de crescimento da biomassa (4, 7). O dimensionamento do volume do biorreator deve ser estabelecido de acordo com o caudal do efluente escolhido, assim como com μ .

Nestes sistemas a relação Q/V_r à qual se obtém a produtividade máxima de biomassa (μ_{max}), pode ser calculada pela equação (14) onde o valor obtido é ótimo de produção (M. Manuela 2007), fundamentada pela:

$$\frac{Q}{V_r} = \mu_{max} \left(\sqrt{1 - \frac{K_s}{K_s + S}} \right) \quad (14)$$

Relação entre o Azoto e Fósforo como reagente limitante

Em sistemas fotoautotróficos (sistemas baseados em algas) usa-se a biossíntese das algas para remoção da maioria do azoto e fósforo inorgânicos. A biossíntese para algas pode ser descrita pela seguinte equação química (15) onde se usa o nitrato como fonte de azoto (Ebeling et al. 2006):



Onde: $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$ representa a fórmula estequiométrica da produção primária das algas. Com base nesta fórmula estequiométrica com uma razão N:P de 16:1, pode-se deduzir que em crescimento equilibrado as microalgas necessitam de 16 átomos de azoto por cada um de fósforo consumido.

Ou seja, a razão N:P pode revelar as condições em que o azoto ou o fósforo são substratos limitantes, significando que para valores onde a razão N:P é superior a 16, o crescimento das algas se encontra limitado por fósforo, e por

sua vez quando a razão N:P é inferior a 16, o crescimento encontra-se limitado por azoto.

Embora esta razão tenha sido estabelecida por Redfield em 1934 (Hecky et al. 1993) para águas salgadas, outros autores defendem que esta razão é superior para águas doces e existem mais exceções do que cumprimento da mesma (Hecky et al. 1993) .

Em 2011, Loladze & Elser determinaram que a razão entre N e P deverá ser de: $N:P = 16 \pm 3$. Wu et al. 2013 sugerem que uma relação N:P entre 5:1 e 8:1 é suficiente para que haja uma remoção de azoto inorgânico eficiente.

6.2 Resultados

Nutriente limitante

A tabela 6.1 mostra que as culturas de microalgas estiveram sempre limitadas pela disponibilidade em fósforo inorgânico sendo, portanto, o fosfato o substrato limitante ao longo de todo o processo experimental.

Tabela 6-1 – Razão de N:P e determinação do nutriente limitante

Tempo (Dias)	N:P	Nutriente limitante
0	20,0 >16	Limitado por P
3	16,6 >16	Limitado por P
4	27,0 >16	Limitado por P
5	28,9 >16	Limitado por P
6	33,0 >16	Limitado por P
7	-	-
10	-	-

Taxas de crescimento do inóculo X e Y

A tabela 6.2 apresenta os valores calculados para as taxas de crescimento específicas dos inóculos X e Y para os diferentes dias obtidas pela equação 1 assim como a concentração de P de PO_4^{3-} disponível no 1º dia utilizado para o cálculo da taxa de crescimento.

Tabela 6-2 – Taxas de crescimento das algas X e Y e concentração correspondente do nutriente limitante

Tempo (Dias)	Inóculo	μ (d ⁻¹)	[P] mg/L
3	X	0,06	2,51
4	X	0,8	2,00
5	X	1,2	1,04
6	X	1,45	0,80
7	X	1,79	0,28
10	X	0,42	0,01
3	Y	0,41	2,30
4	Y	0,9	2,11
5	Y	1,75	0,81
6	Y	2,29	0,61
7	Y	2,37	0,04
10	Y	0,97	0,00

A tabela 6.3 mostra os resultados obtidos usando P como substrato limitante, para determinação do tempo de retenção θ e Volume do reator V_r utilizando a equação 14 e 12 (e desprezando K_d):

Tabela 6-3 – Valores obtidos para diferentes μ e simulação de vários cenários.

	Varição μ P (d)	S (P limitante mg/L)	Ks literatura (P mg/L)	Q (m3/d)	V_r (m3)	θ (d)	Equação
X	0,8	0,20	0,28	10	52,9	5,3	(14)
X	0,8	0,20	0,28	10	30,0	3,0	(12)
X	1,79	0,20	0,28	10	23,6	2,4	(14)
X	1,79	0,20	0,28	10	13,4	1,3	(12)
Y	0,9	0,20	0,28	10	47,0	4,7	(14)
Y	0,9	0,20	0,28	10	26,7	2,7	(12)
Y	2,37	0,20	0,28	10	17,9	1,8	(14)
Y	2,37	0,20	0,28	10	10,1	1,0	(12)

Onde:

μ_{max} P = taxa de crescimento máximo de P

S = concentração de P à taxa máxima μ_{max}

Ks= constante meia velocidade obtida por (Wu et al. 2013)

Q = Caudal a tratar pela Caviar Portugal

V= Volume do reator

θ = tempo de retenção

6.3 Discussão

A razão N/P obtida foi sempre superior 16, como mencionado em 6.1 o que indica que a cultura se encontrava limitada por P desde o 1º dia.

As taxas de crescimento para os primeiros 4 dias são bastante inferiores às dos dias seguintes, em relação com a fase latente (*lag phase*) do crescimento microbiano (Metcalf & Eddy 1995).

As taxas de crescimento experimentais máximas obtidas foram de 1,79 d⁻¹ para o inóculo X e 2,37 d⁻¹ para o inóculo Y. Thiansathit et al. (2015) não obtiveram taxas de crescimento superiores a 0,92 d⁻¹ para algas do mesmo género.

O nº de células máximo foi de 7,8 x 10⁵ células/mL para X e 2,4 x 10⁷ células/mL para Y. Ao décimo dia a alga X já se encontrava na fase de morte, provavelmente limitada por outro fator como a temperatura, que longe dos 25 °C do fitoclima, variou entre 13°C e 20°C (ver Anexo Tabela A-1). A alga Y continuou a crescer até ao fim da experiência, parecendo confirmar vantagens em utilizar estirpes ambientais relativamente a estirpes de laboratório. Não foi pois possível quantificar a densidade máxima a atingir para a alga Y, já que seriam necessários mais dias de experiência.

Os resultados de densidade populacional do inóculo Y vão de encontro ao reportado por Xin, Hong-ying & Jia 2010 e Xin, Hong-ying, Ke, et al. 2010 onde ao 10º dia obtiveram densidades populacionais superiores a 10⁶ que estabilizaram a 10⁷ para tempos superiores a 10 dias. No entanto estas diferenças de valores podem estar relacionadas com o facto das experiências realizadas não terem as condições de operação igualmente controladas.

Para o dimensionamento não se determinaram os coeficientes kd e Ks. O coeficiente Ks foi retirado de bibliografia com o valor de 0,28 mg/L para P como substrato limitante (Wu et al. 2013). Para a determinação de Ks seria necessária estudar o comportamento do crescimento dos inóculos a varias diluições do efluente por forma a obter valores da taxa de crescimento que se possam relacionar com a concentração de P no substrato, sendo que Ks é a concentração de substrato quando a taxa de crescimento é metade da máxima (Ks=μmax/2).

Controlo de V_r e θ

O valor de θ (tempo de retenção hidráulica) deverá ir de encontro ao tempo de crescimento necessário para que os inóculos atinjam a taxa de crescimento máxima, 6 dias neste caso. Para tal o tempo retenção no reator antes de se iniciar um processo de alimentação contínua deverá ser no mínimo de 6 dias.

Para um tempo de retenção desta ordem de grandeza, utilizando a equação (13) deduz-se que V_r em situações desfavoráveis ao crescimento deverá ser próximo de 60m^3 para um caudal de 10 m^3 .

Calculo de V_r e θ

Como medida precaucionista o coeficiente k_d , constante de decaimento endógeno foi desprezado no dimensionamento do biorreator. A componente k_d iria retirar uma porção do tempo de retenção do bioreactor. Considerando que o tempo de residência das microalgas no biorreator será fixo, e determinado pelo caudal afluente igual ao efluente, e que se pretende que elas cresçam à taxa máxima, sendo colhidas continuamente, para valorização da biomassa de algas, o consumo endógeno será mínimo. Este coeficiente é importante caso se queira maximizar a remoção de nutrientes da água em vez de maximizar a taxa de produção de algas. A sua determinação não foi possível porque não se quantificaram os valores de SSV ao longo da experiência nº 3.

Foram calculados V_r e θ , por duas expressões diferentes e compararam-se os valores, com o máximo esperado pela equação (13). Apenas o cálculo para o inóculo Y com a expressão 14 se encontra próximo daquele valor, e vai de encontro aos valores obtidos em (Wu et al. 2013) de 5,2 dias para θ , assim como a taxa de crescimento máxima determinada experimentalmente ao fim de 6 dias.

Na tabela 6.3 apresentam-se os volumes do reator (V_r) para diferentes valores de μ , usando o valor mínimo de μ como representação de condições adversas ao crescimento, e μ máximo como condições favoráveis ao

crescimento. O valor de S adotado foi a concentração de P desejada para a saída do reator. Dado que pela tabela 4.3 dos valores recomendados no sistema RAS da Caviar Portugal, a concentração de P- PO₄ varia entre 0,2 e 0,5 mg/L, o valor adotado para o dimensionamento foi de S = 0,2 mg/L.

Desta forma obteve-se uma gama variada de valores de Vr e θ , sendo que o dimensionamento deve ter em conta o pior cenário, isto é, concentração máxima de P = a 0,2 mg/L e a taxa de crescimento mínima dimensionou-se o volume do biorreator Vr = 47 m³ com um tempo de residência de 4,7 dias, selecionando para o efeito as algas do inóculo Y. Este tempo de residência vai de encontro ao autor Wu et al. 2013 que obteve um tempo de retenção semelhante de 5,2 dias.

Adicionalmente o dimensionamento foi limitado pelo Ks da literatura, sendo que este define quanto fósforo permite o crescimento a metade da taxa de crescimento máximo, permitindo assim variar os valores de μ conforme o pretendido à saída do efluente.

7 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho foram cumpridos todos os objetivos propostos, onde como objetivo principal, se pretendeu dimensionar um biorreator biológico a integrar no processo de produção da Caviar Portugal. Obteve-se um volume para o reator de biológico de aproximadamente 47m³ com um tempo de retenção hidráulico de 4,7 dias, atingindo as recomendações padrão de qualidade de água de entrada para sistemas RAS de esturjão.

A microalga *Scenedesmus sp.* mostrou-se eficaz na remoção de nutrientes da água. De acordo com os resultados obtidos tudo indica que a escolha de uma espécie selvagem poderá apresentar vantagens em relação a espécies laboratoriais, devido à sua capacidade de adaptação a condições mais adversas.

Não obstante à escolha da microalga como solução e forma de remoção de nutrientes no biorreator, as alfaces mostraram-se equiparavelmente capazes de remover formas de azoto da água, no entanto o uso de microalgas apresenta a vantagem da remoção tanto de fontes de azoto como de fósforo.

Nas experiências efetuadas, foi testada também a cortiça. Embora esta apresente um bom potencial na remoção de azoto da água, no caso da aquacultura RAS, poderá apresentar risco tóxico para as culturas aquáticas. Deverão ser feitos estudos adicionais caso se pretenda implementar o uso de cortiça como possível solução no tratamento de efluentes.

Para o futuro recomenda-se que sejam efetuados estudos adicionais em macro-escala de forma a determinar a viabilidade da utilização dos *Scenedesmus sp.* na remediação de nutrientes. As condições de luz são determinantes no crescimento das microalgas e com o *up-scale* deste sistema a sua eficiência pode ser perdida devido à diminuição da área de superfície com o aumento da profundidade dos tanques (Wu et al. 2013).

8 Bibliografia

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A. & Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), pp.257–275.
- Aquaculture and the Environment, Second Edition, T.V.R. Pillay 2004
- Aubin, J., 2006. Characterisation of the environmental impact of a turbot (*Scophthalmus maximus*) re-circulating production system using life cycle assessment. *Aquaculture* 261, 1259–1268
- Boesch, D.F., Burroughs, R.H., Baker, J.E., Mason, R.P., Rowe, C.L., Siefert, R.L., 2001. *Marine Pollution in the United States: Significant Accomplishments, Future Challenges*. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Bronzi, P., Rosenthal, H. & Gessner, J., 2011. Global sturgeon aquaculture production: an overview. *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2), pp.169–175.
- Brown, J.H., 1989. Antibiotics: their use and abuse in aquaculture. *World Aquaculture* 20, 34–43.
- Buhmann, A. & Papenbrock, J., 2013. Biofiltering of aquaculture effluents by halophytic plants: Basic principles, current uses and future perspectives. *Environmental and Experimental Botany*, 92, pp.122–133.
- Chopin, T. et al., 2001. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*, 37(6), pp.975–986.
- Chopin, T. et al., 2010. Integrated Multi Trophic Aquaculture Part II. Increasing IMTA Adoption. *Global Aquaculture Advocate*, (6), pp.17–20.
- CITES “The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora”, 2004; 2006.
- Cole, D.W. et al., 2009. Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(4), pp.369–377.
- Crab, R. et al., 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture*, 270(1-4), pp.1–14.
- Crepaldi, D. & Teixeira, E., 2006. Sistemas de produção na piscicultura. *Revista Brasileira de Reprodução animal*, v.30, n.3/, pp.86–99.
- Dixon, B.A., 2000. Antibiotics. In: Stickney, R.R. (Ed.), *Encyclopedia of Aquaculture*. Wiley, New York
- Dortch, Q. (1990). The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 61, 183–201.
- Dynamics of Pond Aquaculture, Hillary S. Egna, Claude E. Boyd, CRC Press, 21/08/1997
- Ebeling, J.M., Timmons, M.B. & Bisogni, J.J., 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1-4), pp.346–358.

- Edwards, P., R.S.V. Pullin and J.A. Gartner. (1988). Research and Education for the Development of Integrated Crop-Livestock-Fishfarming Systems in the Tropics, ICLARM Studies and Reviews 16, ICLARM, Manila
- Eisler, R., 1998. Copper hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. US Geological Survey, Biological Sciences Division, Biological Science Report, USGS/BRD/BSR – 1997–0002
- Girisha, S.T. et al., 2014. Growing of *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Botryococcus* in sewage water for biodiesel production. Archives of Applied Science Research, 6(1), pp.131–138.
- Goldberg, R.J., Elliott, M.S., Naylor, R.L., 2001. Marine Aquaculture in the United States: Environmental Impacts and Policy Options. Pew Oceans Commission, Arlington, Virginia.
- Grant, C.A. et al., 2001. A IMPORTÂNCIA DO FÓSFORO. , (19), pp.1–5.
- Gross, A., 2001. The effect of effluents from fish hatcheries on slightly disturbed rivers—a case study. In: Falconer, R.A., Blain, W.R. (Eds.), River Basin Management. Wit Press Publications, Southampton, Boston, pp. 205–217.
- Gross, A., 2001. The effect of effluents from fish hatcheries on slightly disturbed rivers—a case study. In: Falconer, R.A., Blain, W.R. (Eds.), River Basin Management. Wit Press Publications, Southampton, Boston, pp. 205–217.
- Halwart, M., Soto, D. & Arthur, J.R. Eds. , 2007. Cage aquaculture Regional reviews and global overview.
- Hamilton, A., 2003. The beluga's blues. TimeAsia. 161:2
- Haroun, B.M., Sharaf, A.M., Ibraheem, I.B.M., 1995. Evaluation of natural products in some common Egyptian marine algae. J. Union, Arab. Biol., 2(B), 137–153, 2nd International Conference 9–11 Sep 1995.
- Hecky, R.E., Campbell, P. & Hendzel, L.L., 1993. The Stoichiometry of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in Particulate Matter of Lakes and Oceans. Limnology and Oceanography, 38(4), pp.709–724.
- Javanmardian, M., Palsson, B.O., 1991. High-density photoautotrophic algal cultures; Design, construction and operation of a novel photobioreactor system. Biotechnol. Bioeng. 38, 1182–1189.
- JSA (Federal Joint Subcommittee on Aquaculture) 2007. Working group on quality assurance in aquaculture production: guide to drug, vaccine, and pesticide use in aquaculture, April 2007 revision.
- Korom, S.F., 1992. Natural denitrification in the saturated zone: a
- Lee, L. Y., Ong, S. L., & Ng, W. J. (2004). Biofilm morphology and nitrification activities: Recovery of nitrifying biofilm particles covered with heterotrophic outgrowth. Bioresource Technology, 95(2), 209–214.
- Loladze, I. & Elser, J.J., 2011. The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. Ecology Letters, 14(3), pp.244–250.
- M. Manuela da Fonseca, José A. Teixeira 2007. Reactores Biológicos, fundamentos e aplicações. Lisboa, Lidel edições técnicas Lda.

- Ma, Y. et al., 2009. Achieving nitrogen removal via nitrite in a pilot-scale continuous pre-denitrification plant. *Water Research*, 43(3), pp.563–572.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganism. Instrumentos Familiares* (Vol. XXXIII).
- Malone, R.F. & Pfeiffer, T.J., 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 34(3), pp.389–402.
- Metcalf & Eddy 1995. *Wastewater Engineering: Treatment disposal and Reuse*, 3rd edition, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi.
- Meyen, F.J.F. (1829). Beobachtungen über einige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae* 14: 768-778, pl. XLIII [43].
- Mirzoyan, N., Tal, Y. & Gross, A., 2010. Anaerobic digestion of sludge from intensive recirculating aquaculture systems: Review. *Aquaculture*, 306(1-4), pp.1–6.
- Monod, J.: “ The Growth of Bacterial Cultures,” *Ann, Rev. Microbiol.*, vol 3, 1949. in Metcalf & Eddy 1995. *Wastewater Engineering: Treatment disposal and Reuse*, 3rd edition, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi.
- Monod, J.: *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*, Herman et Cie., Paris 1942 in Metcalf & Eddy 1995. *Wastewater Engineering: Treatment disposal and Reuse*, 3rd edition, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi.
- Mulholland, M. R., & Lomas, M. W. (2008). Nitrogen Uptake and Assimilation. In D. G. Capone, D. A. Bronk, M. R. Mulholland, & E. J. Carpenter (Eds.), *Nitrogen in the marine environment* (2nd ed., pp. 303-384). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Naylor, R.L. et al., 2000. Effect of aquaculture on world @ sh supplies. , pp.1017–1024.
- Ottinger, M., Clauss, K. & Kuenzer, C., 2015. Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments – A review. *Ocean & Coastal Management*, 119, pp.244–266.
- Pfeiffer, T.J. & Wills, P.S., 2011. Evaluation of three types of structured floating plastic media in moving bed biofilters for total ammonia nitrogen removal in a low salinity hatchery recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering*, 45(2), pp.51–59.
- Piedrahita, R.H., 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture*, 226(1-4), pp.35–44.
- Prein, M. 2007. Comparative analysis of material flows in low input carp and poultry farming: an overview of concepts and methodology. In D.M. Bartley, C. Brugère, D. Soto, P. Gerber and B. Harvey (eds). *Comparative assessment of the environmental costs of aquaculture and other food production sectors: methods for meaningful comparisons*. FAO/WFT Expert Workshop. 24-28 April 2006, Vancouver, Canada. FAO Fisheries Proceedings. No. 10. Rome, FAO. 2007. pp. 183–200
- review. *Water Resour. Res.* 28, 1657–1668.
- Ribbons, D. W.: “Quantitative Relationships between Growth Media Constituents and Cellular Yields and Composition “, in Metcalf & Eddy 1995. *Wastewater Engineering: Treatment disposal and Reuse*, 3rd edition, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi.

- Rusten, B. et al., 2006. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquacultural Engineering*, 34(3), pp.322–331.
- Sanda Maria da Cruz Caetano, 2015. Toxicity Risks Linked to Cyanobacteria Blooms in Southern Portugal Reservoirs. Dissertação de Phd apresentada na Universidade do Algarve
- Shihady, S., 2014. Treatment of Nitrogen Oxides By *Chlorella Vulgaris* Algae in Photobioreactors. , (August).
- Strauss, E.A. & Lamberti, G.A., 2000. Regulation of nitrification in aquatic sediments by organic carbon. *Limnology and Oceanography*, 45(8), pp.1854–1859.
- Subasinghe, R., Soto, D. & Jia, J., 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. *Reviews in Aquaculture*, 1, pp.2–9.
- Summerfelt, S.T., 2006. Design and management of conventional fluidized-sand biofilters. *Aquacultural Engineering*, 34(3), pp.275–302.
- Thiansathit, W. et al., 2015. The kinetics of *Scenedesmus obliquus* microalgae growth utilizing carbon dioxide gas from biogas. *Biomass and Bioenergy*, 76(May), pp.79–85.
- Toerien, D.F., Gerber, A., Lotter, L.H., Cloete, T.E., 1990. Enhanced biological phosphorus removal in activated sludge systems. In: Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 11. Plenum Press, New York, London, pp. 173–219.
- van Rijn, J., Tal, Y. & Schreier, H.J., 2006. Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34(3), pp.364–376.
- Van Uden, N.: “transport-Limited Growth in the Chemostat and Its Competitive Inhibition; A Theoretical Treatment”, *Arch Mikrobiol.*, vol 58, 1967 in Metcalf & Eddy 1995. *Wastewater Engineering: Treatment disposal and Reuse*, 3rd edition, Tata Mcgraw-Hill, New Delhi.
- Wanda F., João S. 1998. *Microbiologia*, Volume I, Lidel, Lisboa
- Wu, Y.H. et al., 2013. An integrated microalgal growth model and its application to optimize the biomass production of *Scenedesmus* sp. LX1 in open pond under the nutrient level of domestic secondary effluent. *Bioresource Technology*, 144, pp.445–451.
- Xin, L., Hong-ying, H. & Jia, Y., 2010. Lipid accumulation and nutrient removal properties of a newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New Biotechnology*, 27(1), pp.59–63.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., et al., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14), pp.5494–5500.
- Yeo, S.E.S., Binkowski, F.F.P. & Morris, J.J.E., 2004. *Aquaculture Effluents and Waste By-products: Characteristics, Potential Recovery, and Beneficial Reuse*.

ANEXOS

Tabela A.1 – Parâmetros medidos in-situ na experiência nº 3

	pH Média Diária	Temp °C Média Diária	Rad (µmol) Média Diária	Evap. (mL) Média Diária
11-03-2016	7,6	20,0	62,3	0,00
12-03-2016	8,2	15,3	65,5	196,32
15-03-2016	8,9	16,8	129,0	121,32
16-03-2016	8,6	16,4	65,0	141,32
17-03-2016	8,7	17,3	79,7	109,47
18-03-2016	8,4	13,0	41,6	134,36
21-03-2016	8,4	14,8	46,5	245,53

MEIO F2 (Guillard, 1975)

Soluções:		Volume a adicionar por:	
A-Standard /B-Concentrada		A – 1litro de Meio/ B – 5 litros de Meio	
1	Nitrato		1 ml
2	Fosfato		1 ml
3	Metais		1 ml
4	Vitaminas		0.1 ml
5	Silicatos *		1 ml

* Só no caso de cultura de diatomáceas

1. SOLUÇÃO DE NITRATOS

	Sal	A	B
1	NaNO ₃	75g	375g
2	Água Destilada	1000ml	1000ml

2. SOLUÇÃO DE FOSTATOS

	Sal	A	B
1	Na ₂ H ₂ PO ₄	5.65g	28.25g
2	Água Destilada	1000ml	1000ml

3. SOLUÇÃO DE METAIS

	Solução/Sal	A	B
1	FeCl ₃ 6H ₂ O sol. Aquosa 30%	6.78ml	33.9 g
2	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4.83g	24.15g
3-7	Solução de Sais Primários	1ml	5ml
8	Água Destilada	1000ml	1000ml

4. SOLUÇÃO DE VITAMINAS (GUARDAR EM FRASCO ESCURO)

	Vitaminas	A	B
1	Vitamina B ₁₂ (Cianocobalamina)	10mg	50mg
2	Vitamina B ₁ (Tiamina)	100mg	500mg
3	Vitamina H (Biotina)	10mg	50mg
4	H ₂ O - esterilizada	1000ml	1000ml

5. SOLUÇÃO DE SILICATOS

	Solução/Sal	A
1	NaSiO ₃ 9H ₂ O	100ml
2	Água Destilada	1000ml

NOTA: TODAS AS SOLUÇÕES, EXCEPTO AS DE VITAMINAS, DEPOIS DE PREPARADAS DEVEM SER ESTERILIZADAS A 120° DURANTE 20 MINUTOS.

Figura 9.8.1 – Fotografia do protocolo de criação do meio F2

