

José Carlos Amaro Marques

Tratamento Terciário de Águas Residuais
Urbanas por Microalgas
Efeito do Tempo de Retenção Hidráulico e Suplementação
com CO₂



2021

José Carlos Amaro Marques

**Tratamento Terciário de Águas Residuais
Urbanas por Microalgas
Efeito do Tempo de Retenção Hidráulico e Suplementação
com CO₂**

Mestrado em Ciclo Urbano da Água

Trabalho efetuado sob orientação de:

Professora Doutora Luísa Barreira (Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade do Algarve; Centro de Ciências do Mar, Algarve)

Doutora Etíele Greque de Moraes (Centro de Ciências do Mar, Algarve)



2021

Tratamento Terciário de Águas Residuais Urbanas por Microalgas

Efeito do Tempo de Retenção Hidráulico e Suplementação com CO₂

Declaração de Autoria do Trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho escrito, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

José Carlos Amaro Marques

(Assinatura)

Copyright ©: José Carlos Amaro Marques

A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.

Agradecimentos

O caminho percorrido até aqui nem sempre foi fácil. No entanto, devido à presença de várias pessoas durante todo meu percurso, fez com que este fosse possível e da forma que o foi! Hoje escrevo este trabalho, ao qual dei a minha total dedicação e empenho durante este último ano, acompanhado de pessoas que nunca desistiram de mim.

Assim, gostaria de começar por agradecer às minhas orientadoras, à Professora Doutora Luísa Barreira, pela total dedicação, preocupação, disponibilidade e confiança demonstradas na minha pessoa e no meu trabalho. À Doutora Etiele Greque de Morais pelo companheirismo, confiança e disponibilidade, demonstradas diariamente. Gostaria ainda de agradecer ao Professor João Varela e a todos os *Marbiotechers*, pela confiança, oportunidades e pelas grandes amizades feitas no ceio do grupo. Um especial agradecimento à Tamára Santos, à Filipa Pinheiro, à Inês Maia, ao Gabriel Bombo, ao Hugo Galvão, à Lisa Schüler e à Marta Oliveira por todo o companheirismo demonstrado durante estes anos.

Aos meus colegas de licenciatura e mestrado por todas as amizades criadas e por todos os momentos de cooperação e companheirismo.

Aos meus amigos e família. Em especial à minha namorada e aos meus pais, aos quais dedico este trabalho, pois sem estas três Pessoas seria de todo impossível ter chegado até aqui e ter conseguido terminar, desta forma, esta etapa!

Por fim, gostaria de agradecer a todos os parceiros do projeto GreenTreat (PTDC/BTA-BTA/31567/2017) e aos técnicos do CCMAR, os quais fizeram com que fosse possível a execução dos trabalhos, de algumas das análises e pela pronta disponibilidade de ajuda. Queria assim agradecer, à Águas do Algarve (ADA); à equipa técnica da ETAR da Quinta do Lago; à Bluemater; à Técnica Vera Gomes e Marta Valente dos serviços CTS do CCMAR e à Professora Margarida Ribau Teixeira e à Vânia Sousa, por toda a ajuda.

Resumo

O aumento da pressão antrópica sobre os recursos hídricos e ocorrências de fenômenos relacionados com as alterações climáticas têm causado cada vez mais períodos de escassez de água. Urge assim a necessidade de encontrar soluções mais económicas e eficientes para o tratamento de águas residuais, capazes de permitir a sua reutilização. O tratamento de Águas Residuais Urbanas (ARU) por microalgas é uma das soluções de tratamento que tem vindo a ser estudada desde há vários anos. É uma alternativa atrativa aos métodos convencionais de tratamento das ARU, pois fornece uma biomassa com potencial de valorização para a produção de biocombustíveis como biogás e bioetanol, e biofertilizantes, entre outros.

Este estudo teve como objetivos: testar a capacidade de tratamento do sistema de reatores piloto GreenDune[®], usando dois TRH (1 e 2d) em duas estações do ano (verão e outono), e a valorização da biomassa obtida; e à escala laboratorial, testar os benefícios da suplementação com CO₂ no tratamento terciário de ARU. Após o estudo confirmou-se que, tanto para o TRH 1d como para o TRH 2d em ambas as estações do ano, o sistema conseguiu cumprir com os parâmetros impostos por lei, com uma remoção de nutrientes de azoto e fósforo (NH₄⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻) entre 48 – 85 %, produzindo maior quantidade de biomassa na campanha de verão. No que diz respeito à valorização da biomassa obtida, a sua elevada percentagem de cinzas limita a aplicação em processos de transformação, como a produção de biocombustíveis, sugerindo-se a sua valorização como biofertilizante. À escala laboratorial, foram realizadas experiências em semi-contínuo suplementadas com diferentes quantidades de CO₂ (6, 12 e 24 ml min⁻¹, durante 1 min). Para a condição de 12 ml min⁻¹, foi possível verificar um aumento na produção de biomassa em cerca de 50 %, em relação ao controlo. Para além da maior produção de biomassa, constata-se um aumento significativo nos níveis de lípidos, hidratos de carbono e proteínas, sendo estes compostos fundamentais na valorização da biomassa produzida.

Concluindo, o trabalho realizado apresenta informações relevantes para o tratamento terciário de ARU utilizando *blooms* naturais de microalgas e para a valorização da biomassa resultante.

Palavras-Chave: Águas Residuais Urbanas; biofixação de CO₂; bio-remoção de nutrientes; microalgas; tratamento terciário

Abstract

The increase in anthropogenic pressure over the water resources, together with climate change, have increased the periods of water scarcity. Therefore, there is an urgent need to find ecohydrological solutions that are more economical and efficient, capable of allowing the use and reuse of wastewater. The treatment of Urban Wastewater (UWW) by microalgae is one of the treatment solutions that has been studied for several years. They are an alternative to the conventional method of WWT, providing a biomass with potential for recovery as biofuels (biodiesel, biogas or bioethanol) or as biofertilizers.

This study aimed, to test the capacity of the pilot GreenDune® photobioreactors, using two TRH (1 and 2d) during two seasons of the year (summer and autumn), for tertiary wastewater treatment and recovery. On a laboratory scale, the benefits of supplementation with CO₂ in the tertiary treatment of ARU were assessed. After the study, it was confirmed that, for both TRH 1d and TRH 2d in both seasons, the system was able to remove 48-85% of the nitrogen and phosphorus nutrients (NH₄⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻). The system produced higher amounts of biomass in the summer season although its valorization potential for biofuels was limited by the high percentage of ash. It is, therefore, proposed that the biomass is valued as a biofertilizer. On a laboratory scale, experiments of tertiary treatment of the real wastewater with a microalgal consortia obtained from the WWTP, supplemented with different amounts of CO₂ (6, 12 and 24 ml min⁻¹, for 1 min.) were performed using a semi-continuous cultivation mode. Supplementation with 12 ml min⁻¹ of CO₂ led to an increase in biomass production of about 50%, compared to the control. In addition to the increased production of biomass, there is a significant increase in the levels of lipids, carbohydrates, and proteins, which are fundamental for the valorization of the biomass.

In conclusion, the work carried out presents relevant information for the tertiary treatment of ARU using natural microalgae blooms and for the valorization of the resulting biomass.

Key words: Urban Wastewater; CO₂ biofixation; nutrient bioremoval; microalgae; tertiary treatment

Índice

<i>Agradecimentos</i>	<i>i</i>
<i>Resumo</i>	<i>ii</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Índice</i>	<i>iv</i>
<i>Índice de Figuras</i>	<i>vi</i>
<i>Índice de Tabelas</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>x</i>
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Águas Residuais Urbanas (ARU)	2
1.3. Tratamentos Convencionais nas ETAR	3
1.3.1. Tratamentos terciários convencionais.....	4
1.4. Tratamentos Terciários de ARU por sistemas de microalgas	5
1.4.1. Tratamento de Águas Residuais Urbanas com <i>blooms</i> naturais	7
1.4.2. Condições de cultivo	10
1.4.2.1. Nutrientes, temperatura, luz e pH	10
1.4.2.2. Reatores e Tempo de Retenção Hidráulico (TRH)	11
1.5. Suplementação e biofixação de CO₂ nos sistemas de tratamento por microalgas	13
1.6. Composição e valorização da biomassa produzida no tratamento de ARU	15
1.7. Projeto GreenTreat	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Material e Métodos	19
3.1. Cultivo/tratamento em escala piloto	20
3.2. Cultivo/tratamento em escala laboratorial	22
3.2.1. Cultivo descontínuo (<i>batch</i>)	22
3.2.2. Cultivo semi-contínuo	23
3.3. Análise laboratorial das amostras	24

3.3.1.	Concentração de biomassa e pH	24
3.3.2.	Análise do efluente e da água tratada	25
3.3.3.	Composição da biomassa microalgal.....	25
3.3.3.1.	Lípidos totais	26
3.3.3.2.	Proteínas	27
3.3.3.3.	Hidratos de carbono	28
3.3.3.4.	Cinzas e Humidade	30
3.4.	Análise estatística dos dados	31
4.	<i>Resultados e Discussão.....</i>	32
4.1.	Experiência piloto	32
4.1.1.	Tratamento de ARU	32
4.1.2.	Composição da biomassa obtida.....	42
4.2.	Tratamento de efluentes em cultivos suplementados com CO₂	46
4.2.1.	Tratamento de ARU	46
4.2.2.	Composição da biomassa obtida.....	52
5.	<i>Conclusões.....</i>	56
6.	<i>Referências Bibliográficas</i>	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Sistema de reatores GreenDune® instalado na ETAR da Quinta do Lago, Faro, ao abrigo do projeto GreenTreat (Adaptado de: Bluemater, 2021)	13
Figura 2 - Esquema simplificado da fotossíntese realizada pelas microalgas (adaptado de: Rosenberg et al., 2008).....	14
Figura 3- Desenho experimental do estudo.....	19
Figura 4 - Sistema de reatores utilizado nas duas fases do estudo: A) Fase i), Sistema piloto de reatores GreenDune® instalados na ETAR Quinta do Lago; B) Fase ii) reatores Bubble column.....	20
Figura 5 - Esquema do sistema de reatores GreenDune® instalado na ETAR Quinta do Lago ao abrigo do projeto GreenTreat (Cerqueira, 2020).....	20
Figura 6 - Esquema laboratorial das análises efetuadas para cada fase experimental. (E) amostra de Entrada; (T) amostra de efluente Tratado; (BM) Biomassa recolhida; (R1) amostra do Reator 1; (R2) amostra do Reator 2; (R3) amostra do R3.....	22
Figura 7 - Curvas de Calibração para obtenção da concentração de biomassa (g L^{-1}) através de densidade ótica (DO), (A) para a experiência em piloto (3.1) e (B) para a experiência em escala laboratorial (3.2).	24
Figura 8 - Curva de calibração (BSA) para método Lowry et al. (1951).....	28
Figura 9 - Curva de calibração (glicose) para método DuBois et al. (1956).....	29
Figura 10 - Dados de precipitação acumulada diária (mm), durante a campanha de outono, para o TRH 1 e 2d. Média mensal de precipitação indicada pela linha azul (Adaptado de IPMA, 2021).....	32
Figura 11 - Temperatura média($^{\circ}\text{C}$) medida no interior dos reatores, na campanha de (A) verão e (B) outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.	33
Figura 12 - Concentração de biomassa (mg L^{-1}) medidas a partir de densidade ótica das amostras recolhidas em cada campanha (A) Campanha de verão; (B) campanha de outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.	34
Figura 13 – Volume de efluente tratado pela ETAR da Quinta do Lago no ano 2020 (ADA, 2021).....	34
Figura 14 - pH médio medido no interior dos três reatores nas campanhas de (A) verão e (B) outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.	35

Figura 15 - Concentrações de N total; NO ₃ ⁻ e NH ₄ ⁺ , no efluente de Entrada e no Tratado para (A; C; E) campanha de verão e (B; D; F) campanha de outono, para ambos os TRH (1 e 2d). A vermelho encontram-se os VLE para cada nutriente imposto pela licença de descarga da ETAR.	37
Figura 16 - Concentrações de PO ₄ ³⁻ ; P total e CQO, no efluente de Entrada e no Tratado para (A; C; E) campanha de verão e (B; D; F) campanha de outono, para ambos os TRH (1 e 2d). A vermelho encontram-se os VLE para cada nutriente imposto pela licença de descarga da ETAR. (*) Valor de concentração de 1060 mg L ⁻¹ de CQO, devido a falha no sedimentador secundário da ETAR, ao 8º dia do TRH 1d, da campanha de outono.....	38
Figura 17 - Taxas de remoção (%) obtidas nas campanhas de (A-B) verão e (C-D) outono, nos (A; C) TRH 1d; (B; D) TRH 2d.	40
Figura 18 - SST (mg L ⁻¹) no efluente de entrada e no efluente tratado, nas campanhas de (A-B) verão e (C-D) outono, para os TRH (A; C) 1d e (B; D) 2d, respetivamente. Linha a vermelho indica o VLE definido para a referida ETAR (35 mg L ⁻¹). (*) concentração de SST no efluente de entrada, no 8º dia, do TRH1d da campanha de outono (C), de 968 mg L ⁻¹ , devido a falha no sedimentador secundário da ETAR.	42
Figura 19 - Percentagens em peso seco (% ps) dos principais compostos presentes na biomassa (lípidos, cinzas, proteínas e hidratos de carbono), (A) campanha de verão e (B) campanha de outono. Em letras maiúsculas encontram-se as análises de significância (P<0,05) entre TRH de cada estação e em minúsculas entre estações.	44
Figura 20 - Concentração de biomassa nas diferentes condições de injeção de CO ₂ testadas em sistema batch na fase laboratorial. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores de OD realizadas em quadruplicados analíticos (4 leituras de absorvâncias) e duplicados biológicos (2 reatores por cada condição) ± Desvio padrão. As linhas no gráfico representam as linhas de tendência para cada crescimento.	46
Figura 21 - (A) Valores de pH nos cultivos, nas diferentes condições de injeção de CO ₂ , testadas em sistema batch na fase laboratorial. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores medidos nos reatores, em duplicados biológicos ± Desvio padrão; (B) Perfis de pH antes e após as injeções de CO ₂ nas culturas.	47
Figura 22 - Concentração de biomassa nas diferentes condições de injeção de CO ₂ testadas em sistema semi-contínuo, na fase laboratorial, onde os primeiros 5 dias (até 5d) foram de adaptação em batch. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores de OD realizadas em quadruplicados analíticos (4 leituras de absorvâncias) e duplicados biológicos (2 reatores por condição) ± Desvio padrão.	49
Figura 23 - Valores de pH, nas diferentes condições de injeção de CO ₂ , testadas em sistema semi-contínuo, na fase laboratorial, onde os primeiros 5 dias (até 5d) foram de adaptação em batch. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores medidos nos reatores em duplicados biológicos ± Desvio padrão.	49
Figura 24 - Concentrações obtidas ao longo do tempo em sistema semi-contínuo, para (A) N total, (B) P total e (C) CQO. Sendo que para os restantes nutrientes as concentrações após tratamento foram na totalidade abaixo dos níveis de deteção dos kits utilizados. A vermelho	

estão delimitados os VLE impostos por lei, sendo (E) a concentração referente ao efluente a tratar. 50

Figura 25 - Taxas médias de remoção do sistema em semi-contínuo..... 51

Figura 26 - Percentagens em peso seco (% ps) dos principais compostos presentes na biomassa (lípidos, cinzas, proteínas e hidratos de carbono), (A) batch e (B) semi-contínuo. Em letras minúsculas foram testadas as significâncias ($P < 0,05$) entre condições em cada experiência, através de ANOVA. (CTRL) condição controle, sem suplementação de CO_2 . .. 53

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição típica de ARU domésticas (Adaptado de Liu & Lipták, 2000).....	3
Tabela 2 - Reações base dos consórcios microalgas-bactérias em sistemas de tratamento de ARU (Adaptado de: Acién et al., 2016).....	8
Tabela 3 – Espécies de microalgas utilizadas no tratamento de diferentes tipos de Águas Residuais (Adaptado de Plöhn et al., 2021)	9
Tabela 4 - Parâmetros operacionais obtidos a partir do modelo cinético de Verhulst, para as condições de CO ₂ testadas, em reatores bubble column de 1L de volume útil. ($\theta_{min.}$) Taxa mínima de renovação (d); (θP) Taxa de renovação para a máxima produção (d); (QP) Caudal para a máxima produtividade (L d ⁻¹); (XP) Concentração de biomassa em estado estacionário (mg L ⁻¹); ($(Pv)P$) Produtividade volumétrica (mg L ⁻¹ d ⁻¹)......	48
Tabela 5 - Percentagens elementares de C, H e N da biomassa produzida na experiência piloto e laboratorial (média ± desvio padrão).....	54

Lista de Abreviaturas

- ADA – Águas do Algarve;
- AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*;
- ApR – Água para Reutilização;
- ARU – Águas Residuais Urbanas;
- ATP – Adenosina Trifosfato;
- BSA – Albumina Soro de Bovino;
- CBO – Carência Bioquímica de Oxigénio;
- CCMAR – Centro de Ciências do Mar;
- CNA – Ciclo Urbano da Água;
- COT – Carbono Orgânico Total;
- CQO – Carência Química de Oxigénio;
- CUA – Ciclo Urbano da Água;
- DO – Densidade Ótica;
- E – Efluente de entrada;
- ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais;
- FBR_s – Fotobiorreatores;
- GEE – Gases com Efeito de Estufa;
- IPMA- Instituto Português do Mar e da Atmosfera;
- MOC – Microscópio Ótico Composto
- R1 – Reator GreenDune 1;
- R2 – Reator GreenDune 2;
- R3 – Reator GreenDune 3;
- SS_{Sed} – Sólidos Suspensos Sedimentáveis;
- SST – Sólidos Suspensos Totais;
- T – Efluente tratado;
- TRH – Tempo de Retenção Hidráulico;
- VLE – Valor Limite de Emissão.

1. Introdução

1.1. Enquadramento do tema

A água é um dos recursos naturais mais valiosos do planeta, responsável pela origem da vida e pela sua manutenção. O Ciclo Natural da Água (CNA) permite que esta molécula (H₂O) exista nas diversas formas e estados físicos. Contudo, a água doce tem-se tornado um bem essencial escasso, devido à pressão antrópica, causada pelo aumento da população, e pelas sucessivas alterações climáticas aceleradas pelo aquecimento global. Esta escassez afeta quatro em cada dez pessoas, sendo que cerca de 2,1 mil milhões de pessoas no mundo não têm acesso a água potável e 4,5 mil milhões não possuem saneamento básico (Do Monte & Albuquerque, 2010; ONU, 2021). Uma vez que 80 % das águas residuais retornam aos ecossistemas sem qualquer tratamento ou reutilização, torna-se necessário a implementação de medidas e métodos capazes de reutilizar e gerir a água, e os recursos hídricos, da forma mais sustentável possível (Duarte, 2007).

De forma a diminuir o impacto negativo nos ecossistemas e no ambiente, é obrigatório, na Comunidade Europeia, e em muitos outros países, o tratamento das Águas Residuais Urbanas (ARU), antes de serem descartadas para o meio recetor. Em Portugal, são descarregados para os ecossistemas, através das Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) cerca de 547 milhões de m³ de água residual doméstica tratada, por ano. Mundialmente, cerca de 70 % da água consumida no Ciclo Urbano da Água (CUA) é usada na produção agrícola, 18 % em uso industrial e 12 % para uso doméstico. Desta forma, para além de tratamento para um descarte seguro para o meio ambiente, existe a necessidade de reutilização das águas residuais tratadas, por forma a diminuir o uso de água doce com qualidade para consumo humano em usos onde esta não se justifica, como são caso a lavagem de ruas, a extinção de incêndios, usos de serviço nas próprias ETAR, arrefecimento de sistemas de manutenção, rega e lavagem de veículos, entre outros (FAO, 2016; ERSAR, 2019).

Para a segura reutilização e descarte para o meio ambiente, é necessário que as Águas para Reutilização (ApR) se encontrem livres, ou dentro de valores estipulados por lei, de diversos parâmetros da sua composição. Caso disto são, os níveis de matéria orgânica, na medida de Sólidos Suspensos Totais (SST), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) e Carência Química de Oxigénio (CQO), nutrientes como o fósforo (P), azoto (N), entre outros. Também parâmetros como o pH, turvação e desinfecção devem ser tidos em conta. Isto, por

forma, a diminuir a eutrofização dos ecossistemas e a garantir segurança para a saúde pública (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho; Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de agosto).

1.2. Águas Residuais Urbanas (ARU)

No CUA, a água é captada e tratada para consumo humano, utilizada e descartada, juntamente com diversos resíduos produzidos pelo Homem (Marques & Sousa, 2007). Dependendo da sua origem, as Águas Residuais Urbanas (ARU) podem ser industriais, domésticas ou mistas. As ARU industriais são tratadas, primeiramente pelas próprias indústrias, de modo a diminuir a sua carga orgânica e outros resíduos, como poluentes emergentes (metais pesados, compostos farmacêuticos, antibióticos, entre outros), aproximando a sua qualidade ao que é exigido por lei para a sua descarga no meio natural ou na rede pública de Águas Residuais Urbanas (ARU). Assim, podem ser devolvidas ao meio recetor ou enviadas para a rede de AR públicas, de modo a serem tratadas pelas ETAR. As águas residuais domésticas são encaminhadas diretamente, através da rede pública para as ETAR de modo a serem tratadas antes da sua devolução ao meio recetor ou para reutilização, conforme os parâmetros exigidos por lei (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho; Decreto-lei nº 236/98, de 1 de agosto; Decreto-Lei nº 119/19, de 21 de agosto). Assim, as ETAR podem receber Águas Residuais Urbanas mistas, ou seja, influentes compostos por AR domésticas e industriais.

A composição das ARU é bastante variável, de zona para zona, sendo muitas vezes referida como um *fingerprint* da população que dela faz uso. Estas águas ao chegarem às ETAR, apresentam na sua composição elevados níveis de matéria orgânica biodegradável, sólidos suspensos, areias, gorduras, detergentes, compostos recalcitrantes (fármacos e outras drogas), nutrientes (fósforo e azoto) e compostos expelidos pelo metabolismo humano (e.g., cafeína). Estas apresentam características físico-químicas como cheiro, elevada presença de sólidos e turbidez, valores extremos de pH, elevada Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO), e Carência Química de Oxigénio (CQO), assim como de Carbono Orgânico Total (COT). Biologicamente, estes efluentes apresentam coliformes fecais em grande concentração, *estreptococos*, patogénicos específicos e vírus. Relativamente aos componentes inorgânicos caracterizam-se pela presença de alguns elementos como o Ferro (F), o Manganês (Mn), Cloretos (Cl^-), Sulfatos (SO_4^{2-}), Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb), Crómio (Cr), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Amónia (NH_4^+), Nitritos (NO_2^-), Nitratos (NO_3^-) e P (Tabela 1; Liu & Lipták, 2000).

Surge assim, por parte das ETAR, a necessidade em otimizar os tratamentos adequados, através de processos físicos, químicos e biológicos. Estes têm como objetivo dar resposta às diferentes características das ARU, tendo por base o cumprimento dos valores legais de descarga e a proteção ambiental (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho; Decreto-lei nº 236/98, de 1 de agosto).

Tabela 1 – Composição típica de ARU domésticas (Adaptado de Liu & Lipták, 2000)

Constituintes	Intervalo de concentrações (mg L ⁻¹)	Constituintes	Intervalo de concentrações (mg L ⁻¹)
Sólidos Totais (ST)	350 – 1200	P _{Total}	4 – 15
Sólidos Totais Dissolvidos (STD)	250 – 850	P _{Org.}	1 – 5
Sólidos Suspensos Totais (SST)	100 – 350	P _{Inorg.}	3 – 10
CBO ₅ (TR 5 dias; 20 ° C)	110 – 400	Cloretos (Cl ⁻)	30 – 100
COT	80 – 290	Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	20 – 50
CQO	250 – 1000	Alcalinidade (CaCO ₃)	50 -200
N _{Total}	20 – 85	Gorduras	50 – 150
N _{Org.}	8 – 35	Coliformes Totais	10 ⁶ – 10 ⁹
Amónia (NH ₄ ⁺)	12 – 50	Compostos Orgânicos Voláteis (COV)	100 – 400

1.3. Tratamentos Convencionais nas ETAR

As ETAR são infraestruturas onde são realizados tratamentos físicos, químicos e biológicos, às águas residuais domésticas e/ou mistura com águas residuais industriais previamente tratadas. É função das ETAR proceder à diminuição da concentração, de todos os resíduos das águas residuais, garantindo a segura libertação dessas águas no ambiente. Em Portugal, cerca de 547 milhões de m³/ano de ARU são descarregados pelas ETAR sendo que apenas 1,2 % são reutilizadas. A reutilização de ARU é uma das possíveis formas de mitigar a escassez de água, devido às alterações climáticas, aquecimento global e aumento da pressão sobre recursos hídricos com o aumento da população. Essa solução passa pela necessidade de criar sistemas de tratamento mais eficientes, ecológicos, económicos e fáceis de gerir (ERSAR, 2019).

Na maioria das ETAR os tratamentos estão organizados em: i) pré-tratamento ii) tratamento primário, iii) tratamento secundário e iv) tratamento terciário. As ARU ao chegarem às ETAR através das redes de saneamento, e sofrem um pré-tratamento (físico), para a remoção dos sólidos de maiores dimensões, através de métodos de gradagem e/ou

desarenação, recorrendo a equipamentos mecânicos. Este tem como objetivo a remoção dos resíduos sólidos como as areias, matéria orgânica grosseira, detritos, e outros que são lançados na rede de esgotos. Seguidamente, é realizado o tratamento primário onde os influentes são sujeitos a processos de floculação e sedimentação/decantação primária para a eliminação de partículas menores em suspensão. Nesta etapa são removidos os sólidos suspensos totais (SST), principalmente os sólidos suspensos sedimentáveis (SS_{sed}), de matéria orgânica e inorgânica, permitindo uma remoção de 50-70 % de SST e 25-40 % de CBO_5 (Metcalf & Eddy, 2003). Posteriormente, as ARU passam para o tratamento secundário (biológico), em reatores onde é realizada a decomposição da matéria orgânica (Metcalf & Eddy, 2003; Do Monte *et al.*, 2016). Este, considerado o processo fulcral, dá-se a partir do crescimento microbiano por via aeróbica ou anaeróbica, ou através de filtros percoladores e lagoas de oxidação. Desta forma, este tratamento permite a diminuição significativa dos SST e de CBO_5 , clarificando a água (Metcalf & Eddy, 2003).

Na grande maioria das ETAR, as ARU são sujeitas a tratamentos, que se consideram suficientes até ao secundário, sendo estes necessários para o tratamento básico, de modo a retirar o excesso de carga orgânica e de resíduos. No entanto, torna-se necessário a realização de tratamento terciário, quando o meio recetor é considerado vulnerável a eutrofização ou quando a água residual tratada tem como objetivo a reutilização (ApR) (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho; Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de agosto; Metcalf & Eddy, 2003; Decreto-lei nº 119/19, de 21 de agosto).

1.3.1. Tratamentos terciários convencionais

Os tratamentos terciários ou de afinação têm como principal objetivo a remoção da carga de nutrientes, como o N e a NH_4^+ que, em concentrações elevadas, são capazes de criar desequilíbrios no meio recetor, onde a água é descarregada. Estes tratamentos são fundamentais nas ETAR onde o destino final das águas tratadas é um ecossistema sensível a eutrofização ou quando é intuito a reutilização das mesmas, ou seja, ApR (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho; Decreto-lei nº 119/19, de 21 de agosto). É assim garantido que os efluentes não apresentam uma concentração de nutrientes acima da capacidade de biorremediação dos ecossistemas mais sensíveis e o cumprimento legal dos parâmetros para ApR consoante o fim a que se destinam (Metcalf & Eddy, 2003; Maier *et al.*, 2009; Do Monte *et al.*, 2016).

Os mesmos, convencionalmente, são realizados em reatores onde se dá a nitrificação, no qual é injetado oxigénio nos efluentes por forma a reagir com NH_4^+ convertendo-a em NO_2^- e de seguida em NO_3^- seguindo-se desnitrificação, onde os NO_3^- são convertidos a azoto gasoso (N_2), através da ação de bactérias nitrificantes em comunhão com uma fonte de carbono orgânico (Metcalf & Eddy, 2003; Lazarova & Bahri, 2005). Estes processos podem-se dar em vários tipos de reatores, como são exemplo os BioFOR[®] ou em reatores de discos biológicos, ou ainda, durante o tratamento secundário. Contudo, uma das grandes problemáticas destes tratamentos são os elevados gastos energéticos associados à necessidade de forte arejamento, adição de uma fonte de carbono, e à libertação de gases com efeito de estufa, como o dióxido de carbono, amoníaco, metano e óxidos nitrosos (CO_2 , NH_3 , CH_4 , N_2O) resultantes das reações de nitrificação/desnitrificação, e formação de lamas. As lamas, contaminadas com os microrganismos do processo (bactérias aeróbias e anaeróbias), são um resíduo difícil de gerir, necessitando de inativação, geralmente por incineração, com custos associados (Metcalf & Eddy, 2003; Acien *et al.*, 2016; Do Monte *et al.*, 2016).

1.4. Tratamentos Terciários de ARU por sistemas de microalgas

Dada a necessidade de colmatar a problemática subjacente aos processos aeróbios convencionais, surgem novos processos com o objetivo de tornar os tratamentos de efluentes mais sustentáveis e menos dispendiosos e custosos, através de tecnologias alternativas, como são caso os sistemas que recorrem às microalgas (De Farias Silva *et al.*, 2020).

As microalgas são organismos fotossintéticos unicelulares, que ao utilizar como fonte de energia a radiação solar transformam o CO_2 em matéria orgânica, convertendo assim energia solar em energia química sob a forma de biomassa (Mata *et al.*, 2010; Demirbas & Demirbas, 2011). A sua composição bioquímica consiste fundamentalmente em hidratos de carbono, proteínas e lípidos, que têm funções estruturais e metabólicas, como elementos fundamentais no crescimento, divisão celular e armazenamento de energia (Williams & Laurens, 2010). Devido ao seu conteúdo bioquímico, as microalgas são produzidas e cultivadas à escala industrial apresentando elevado valor económico (Clarke *et al.*, 2012).

As microalgas podem ser classificadas consoante as suas características morfológicas, pigmentos fotossintéticos, composição química dos produtos do seu metabolismo e proximidade filogenética (Gonçalves, 2012). Assim, são geralmente agrupadas em algas verdes (Chlorophyceae), douradas (Chrysophyceae), diatomáceas (Bacillariophyceae) ou

cianobactérias (Cyanophyceae), também conhecidas como algas azuis-verdes procariotas (Richmond, 2004; Demirbas & Demirbas, 2011).

As microalgas podem crescer com base em quatro tipos de metabolismo: 1) Fotoautotróficas, que se desenvolvem somente através da fotossíntese; 2) Heterotróficas que recorrem unicamente a compostos orgânicos como fonte de carbono e energia; 3) Mixotróficas que utilizam ambas as formas de carbono, ou seja, orgânico e inorgânico (CO₂), sendo capaz de crescer autotroficamente e heterotroficamente; 4) Fotoheterotróficas, que dependendo da concentração de compostos orgânicos e da luminosidade disponível, realizam fotossíntese, apenas no caso de necessitarem de processar compostos orgânicos como fonte de carbono (Gouveia, 2011).

O cultivo de microalgas possui uma elevada produtividade, capacidade de serem cultivadas em terras não aráveis e adaptabilidade, podendo ser cultivadas ao longo de todo ano. A biomassa produzida pode ser aplicada em diversas áreas, como na indústria alimentar, produção de rações, cosméticos, biofertilizantes ou biocombustíveis. Além disso, podem ser cultivadas com recurso a efluentes, onde os nutrientes e a matéria orgânica presentes nessas águas são utilizados como fonte nutricional, biorremediando os mesmos e sendo cotadas como técnicas de tratamento de águas residuais (Harun *et al.*, 2010; Mata *et al.*, 2010; Varfolomeev & Wasserman, 2011).

O tratamento terciário de efluentes com microalgas tem como vantagem a elevada capacidade de fixação e remoção de nutrientes por estes microorganismos, uma vez que estes são usados para o seu metabolismo, sem a produção de gases de efeito de estufa e sem necessidade de elevados gastos com arejamento (Acién *et al.*, 2016). Além disso, a biomassa produzida pode ser valorizada para a produção de biocombustíveis e biofertilizantes, contrariamente ao que acontece com algumas lamas dos processos convencionais (Arbib *et al.*, 2014; Acién *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2017).

Arbib *et al.* (2014) realçaram a capacidade de diversas espécies de microalgas para processos de tratamento de águas residuais. Neste estudo, os autores cultivaram, em condições controladas, *Scenedesmus obliquos*, *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri* e um *bloom* natural em água residual artificial e natural. Obtiveram, tanto para o *bloom* natural, como para as espécies individuais, taxas de remoção de nutrientes superiores a 90 e 98 %, para N e para fósforo (P), respetivamente. Além da eficiência no tratamento, o *bloom* natural obteve a maior concentração de biomassa final chegando a 1,95 g L⁻¹, em peso seco (Arbib *et al.*, 2014).

Schulze *et al.* (2017) cultivaram a espécie *Tetraselmis* sp. CTP4 para o tratamento de ARU, por forma a verificarem a capacidade de remoção de nutrientes, antes e após, os

processos de nitrificação das ETAR. O cultivo foi realizado em *batch* e em contínuo utilizando um TRH de 6,6 d. Alcançaram valores de produtividade semelhantes nas condições contínuas e em *batch* ($0,343 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e taxas de absorção máximas de $0,031 \text{ g N L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $0,006 \text{ g P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ usando o efluente antes da nitrificação como solução de cultivo. Desta forma, *Tetraselmis* sp. CTP4, também, é uma espécie promissora para o tratamento de ARU, podendo um sistema de microalgas com a mesma substituir o dispendioso processo de nitrificação (Schulze *et al.*, 2017).

1.4.1. Tratamento de Águas Residuais Urbanas com *blooms* naturais

As microalgas, por se encontrarem distribuídas pelos diversos meios aquáticos no planeta, acabam por estar presentes em todas as águas, incluindo nas ARU, de forma natural. Os *blooms* naturais caracterizam-se, assim, pela presença de várias espécies de microrganismos, sobretudo microalgas nativas do meio onde foram cultivadas. Desta forma, ao disponibilizar nutrientes, luz e arejamento é possível aumentar a sua concentração por forma a ser criado um cultivo de *bloom* natural.

Nas ARU os principais nutrientes presentes, N e P, são fundamentais para a multiplicação e processo metabólico das microalgas, fazendo destes, organismos capazes de os remover dos efluentes (De Farias Silva *et al.*, 2020). Desta forma, desde há vários anos, que são estudadas para este fim. Nos anos 80, Lavoie & De La Noüe (1985) estudavam, à escala laboratorial, o desempenho de várias espécies de microalgas para tratamento terciário de ARU. Neste estudo, foi avaliada a remoção de N por culturas de microalgas (monoalgais) com diferentes concentrações celulares, tendo-se obtido taxas de remoção de aproximadamente 100 %, em reduzido espaço de tempo, cerca de 15 min com uma cultura de $2,6 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, em peso seco. Embora este estudo não seja comparável com um sistema de tratamento de efluentes em contínuo, demonstra a capacidade das microalgas para biofixarem os compostos azotados (Lavoie & De La Noüe, 1985).

Outros estudos, como o de Ación *et al.* (2016) destacam o desempenho na remoção de nutrientes por consórcios de microalgas (incluindo *blooms* naturais), onde podem ocorrer também consórcios de microalgas-bactérias. Neste caso, as bactérias heterotróficas consomem os resíduos de matéria orgânica biodegradável produzindo CO_2 . Este é consumido pelas microalgas que, por sua vez, ao fixarem nutrientes das ARU e ao realizarem a fotossíntese produzem O_2 , principalmente em tratamentos secundários, onde existe carga orgânica (Tabela 2).

Tabela 2 - Reações base dos consórcios microalgas-bactérias em sistemas de tratamento de ARU (Adaptado de: Acién *et al.*, 2016)

Reações base das microalgas	
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightarrow \text{Biomassa microalgal} + \text{O}_2$	Fotossíntese
$\text{NO}_3^- + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + 7\text{OH}^-$	Redução de nitratos
Reações base das bactérias	
$\text{CQO} + \text{O}_2 + \text{Nutrientes} \rightarrow \text{Biomassa bacteriana} + \text{CO}_2$	
$\text{NH}_4^+ + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Nitrificação
$8\text{NO}_3^- + 5\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow 8\text{HCO}_3^- + 6\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 + 4\text{N}_2$	Desnitrificação

Contudo, tal como Acién *et al.* (2016) indicam no seu estudo, em situações onde o efluente apresenta baixa carga de matéria orgânica (fonte de carbono) a proliferação de bactérias pode ser diminuta, aumentando somente nos primeiros 2–3 dias e diminuindo, posteriormente, para valores abaixo de 10 mg L⁻¹, verificando-se uma predominância quase total de espécies de microalgas. Esta situação verifica-se nos tratamentos terciários, onde a carga orgânica é residual e a concentração de nutrientes, principalmente de N, é considerável. Assim, a diminuição da proliferação bacteriana e proliferação de microalgas pode levar ao aumento de pH (para valores superiores a 9) no meio, devido à diminuição de CO₂ dissolvido podendo levar à restrição do crescimento microalgal. Segundo Acién *et al.* (2016) é possível verificar que o crescimento microalgal consegue ser promissor com razões de C/N/P perto de 100/14/2. Nos efluentes urbanos, devido à impossibilidade de controlo destas concentrações de nutrientes, a monitorização destes parâmetros e a possível suplementação do meio, poderão ser uma alternativa a esta limitação. Quanto mais aproximadas desta razão, maior a produtividade microalgal e, por conseguinte, o aumento da eficiência de remoção (Acién *et al.*, 2016).

Segundo a revisão de Abdel-Rauof *et al.* (2012), os sistemas de tratamento por microalgas conseguem ser eficazes em várias aplicações, como tratamento de efluentes de suínicultura, agroindustriais, industriais, resíduos agrícolas e alimentares, para além, da remoção de metais pesados e outros compostos tóxicos (Tabela 3) (Abdel-Rauof *et al.*, 2012; Plöhn *et al.*, 2021).

Assim, face à variabilidade destes fatores no efluente, é necessário que as condições de cultivo e operacionalização por microalgas estejam em constante adaptação por forma a serem mais eficazes e resilientes.

Tabela 3 – Espécies de microalgas utilizadas no tratamento de diferentes tipos de Águas Residuais (Adaptado de Plöhn et al., 2021)

Tipo de AR	Origem	Espécie utilizada	Referência
Urbana	ARU	<i>Chlorella vulgaris</i> sp. ZTY4, S. sp. ZTY2, S. sp. ZTY3	Zhang et al., 2013
	Tratamento secundário de ARU	<i>Botryococcus braunii</i>	Sawayama et al., 1992
Agrícola	Animal	<i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 265), <i>Euglena gracilis</i> (SAG 1224)	Park et al., 2009
	Lacticínios	<i>Scenedesmus quadracauda</i> , <i>Tetraselmis suecica</i>	Daneshvar et al., 2019
		<i>Diplosphaera</i> sp. MM1	Liu et al., 2016
	Tratamento de pescado	<i>Oocystis</i> sp.	Riaño et al. 2011
	Suinicultura	<i>Chlorella vulgaris</i> (FACHB-8), <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (FACHB-5), <i>Haematococcus pluvialis</i> (FACHB872), <i>Scenedesmus obliquus</i> (FACHB-12), <i>Spirulina platensis</i> (FACHB-440), <i>Porphyridium cruentum</i> (FACHB-1118)	Wang et al., 2016
		<i>Scenedesmus acutus</i> (P-F-6), <i>Scenedesmus spinosus</i> (P-F-77), <i>Scenedesmus quadricauda</i> (P-F-70)	Kim et al., 2007
	Aviário	<i>Chlorella minutissima</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Scenedesmus bijuga</i>	Singh et al., 2011
Industrial	Papel	Mixed culture containing two <i>Scenedesmus</i> sp.	Usha et al., 2016
	Curtume	<i>Chlorella vulgaris</i>	Das et al., 2017
	Têxtil	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Pathak et al., n.d.
	Adega	<i>Diplosphaera</i> sp. MM1	Liu et al., 2016

1.4.2. Condições de cultivo

1.4.2.1. Nutrientes, temperatura, luz e pH

As microalgas para o seu metabolismo necessitam de energia luminosa e nutrientes (micro e macronutrientes) que servem de fonte de carbono, N e P. Para além destes também condições como a temperatura, o pH e a dinâmica do meio onde se encontram, são relevantes para o seu crescimento (Behrens, 2005). É assim necessário para o cultivo microalgal ter em conta diversos fatores, como o design dos reatores, o seu arejamento, a salinidade, turbulência, turbidez, pH, temperatura, luminosidade e concentração de nutrientes. Neste âmbito, é fundamental a existência de estudos que visem a otimização destes fatores para incremento da multiplicação celular, de modo a aumentar a eficiência dos sistemas de tratamento por microalgas (Suali & Sarbatly, 2012). Uma vez que os requisitos são diferentes por parte de cada espécie, não é possível indicar valores ótimos aplicáveis a todas as situações.

Quanto à intensidade luminosa, em caso de intensidade excessiva, o nível de saturação pode ser atingido impedindo o crescimento das microalgas (fotoinibição) (Richmond, 2004). Assim como para a temperatura não é aconselhável usar valores superiores a 30°C, uma vez que são temperaturas demasiadas altas para a maioria das espécies, inibindo o seu crescimento (Suali & Sarbatly, 2012).

A variação do pH do meio está diretamente relacionada com a concentração de CO₂, visto que o aumento do pH, no meio de cultura, deve-se ao consumo do CO₂, por parte das microalgas. O seu desequilíbrio pode causar inibição do crescimento microalgal, sendo que as microalgas se desenvolvem, preferencialmente, em meios com pH entre 7–9 (Pandey *et al.*, 2013). Para além disto, devido ao aumento de pH, a amónia (NH₄⁺) é facilmente convertida em amoníaco (NH₃), que para além de apresentar maior toxicidade para as células, é volátil, deixando o azoto de estar na forma biodisponível e passando para a atmosfera como gás poluente (Morales-Amaral *et al.*, 2015) (Equação 1).



A concentração de CO₂ no meio pode conduzir a uma variação da taxa de crescimento e produção de biomassa, uma vez que este é fundamental no seu processo metabólico. Tal como percecionado, são vários os fatores que tornam o processo de otimização do crescimento de microalgas difícil de prever, devendo-se, em grande parte, aos diferentes tipos

de metabolismo que algumas espécies de microalgas podem adotar, em função das condições onde estão inseridas.

No tratamento de efluentes os fatores de cultivo estão sujeitos a variações dependendo das estações do ano, em condições *outdoor* (e.g. luz e temperatura), e das do efluente que é utilizado no cultivo (e. g. concentração de nutrientes). Nestes casos, a utilização de *blooms* naturais, tanto entre consórcios de microalgas e bactérias ou, somente, microalgas, são uma das formas de contornar a situação da instabilidade das culturas face às variações ambientais e do efluente. As diferentes espécies adaptam-se e competem entre elas, conforme as variabilidades do meio nutricional e ambiental ao longo do cultivo (nutrientes, temperatura e intensidade luminosa). Assim, fazem com que os *blooms* naturais possam regular-se entre a dominância de microalgas ou de microalgas e bactérias. Desta forma, o crescimento de *blooms* naturais permite a existência de vários tipos de metabolismos (heterotrófico, autotrófico e mixotrófico), tendo como vantagens a adaptação à variação da intensidade de luz e concentração de nutrientes, levando a maior produção de biomassa e biocompostos de interesse que podem ajudar a valorizar a biomassa (Ferrell *et al.*, 2010). Estes tipos de metabolismo permitem rentabilizar compostos orgânicos no meio e reduzir as perdas de biomassa durante a ausência de luz (Heredia-Arroyo *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012), assim como, no tratamento de águas, o consumo de nutrientes pelas diferentes espécies microalgais. Estas funcionam como estimuladores de crescimento bem como reguladores do meio, uma vez que estabilizam os compostos nas suas formas biodisponíveis para assimilação por parte destas (Acién *et al.*, 2016). Todavia, a utilização de *blooms* naturais e, conseqüentemente, a existência de consórcios continuam a ser uma importante solução para a melhoria da robustez dos sistemas de tratamento de ARU por microalgas (Acién *et al.*, 2016).

1.4.2.2. Reatores e Tempo de Retenção Hidráulico (TRH)

Para o cultivo microalgal existem vários tipos de fotobiorreatores (FBRs) dividindo-se em abertos ou fechados. Os reatores fechados, como tubulares e painéis, são mais protegidos de contaminantes externos, sendo mais utilizados na produção de biomassa para obtenção de compostos de elevado valor sob condições controladas e produção de alimentos. Os reatores abertos, como são exemplo os *raceway ponds*, são canais circulares abertos, onde o cultivo com baixa profundidade (10 – 30 cm) percorre o sistema pela impulsão de um sistema de pás. Os sistemas abertos são mais utilizados para tratamento de efluentes e noutras aplicações que

não necessitem de manter condições assépticas, como para produção de biocombustíveis ou biofertilizantes (Christenson & Sims, 2011).

Os sistemas abertos foram os primeiros a serem desenvolvidos e aplicados nos tratamentos de águas residuais por microalgas, pois permitem a obtenção de uma elevada penetração da radiação solar na coluna de água, a baixos custos. No entanto, os *raceways* apresentam algumas desvantagens, no tratamento de ARU, tais como: a necessidade de grandes áreas de ocupação, a sensibilidade às condições climáticas, a ocorrência de elevada evaporação de água, menor produtividade e, conseqüentemente, elevado Tempo de Retenção Hidráulico (TRH). O TRH consiste no tempo que o efluente permanece retido no sistema de tratamento, neste caso, no interior dos reatores, até estar tratado e poder ser descarregado (Demirbas, 2010; Lam & Lee, 2012; Pires *et al.*, 2012). Tal como Razzak *et al.* (2013) indicam no seu estudo, quanto maior o TRH maiores serão as taxas de remoção de nutrientes dos efluentes a tratar, estando este, também, relacionado com o tipo de reator. Neste estudo, concluíram que com um TRH de 3 dias é possível a remoção de 99% da amónia presente no efluente e 3 a 4 dias para a remoção de fosfatos. A diminuição da retenção hidráulica é uma vantagem para a eficiência das ETAR, pois o objetivo é que os tratamentos sejam realizados com taxas de remoção de nutrientes elevadas no menor espaço de tempo possível (menor TRH) (Razzak *et al.*, 2013).

Assim, dadas as necessidades de evolução a este nível, têm sido desenvolvidos novos FBRs específicos para tratamento de efluentes por microalgas como os reatores GreenDune®. Estes consistem em reatores em formato semi-cúbico, de acrílico, onde na zona inferior frontal, existe um cilindro de arejamento que se liga a uma bomba de arejamento, colocada em série, formando no interior de cada reator um fluxo circular de biomassa para que esta circule entre a zona fótica e a zona mais interna do reator (Figura 1). Relativamente ao volume, apresentam uma maior capacidade de tratamento (480 L m⁻² de volume útil) comparativamente aos *raceway ponds* (152 L m⁻² para um *raceway* de 0,15 m de profundidade). Podem dispor-se sequencialmente, aumentando o TRH ou em paralelo, criando várias linhas de tratamento, aumentando a capacidade de volume para o tratamento. No final de cada linha de tratamento, encontra-se um tanque de sedimentação, onde se deposita a biomassa produzida, por gravidade (Figura 1). A biomassa recolhida do fundo do sedimentador segue para posterior valorização e a água tratada é retirada pela superfície dos tanques.

O sistema GreenDune® apresenta, assim, bastantes vantagens comparativamente aos sistemas convencionais de tratamento com microalgas. Estas passam pela diminuição da área

de ocupação e o aumento da eficiência de tratamento, com a redução de TRH, conseguindo atingir os parâmetros de descarga definidos por lei em menos tempo e com menos utilização de espaço. Paralelamente, ainda tem um baixo custo operacional e a capacidade de integração nas paisagens rurais.

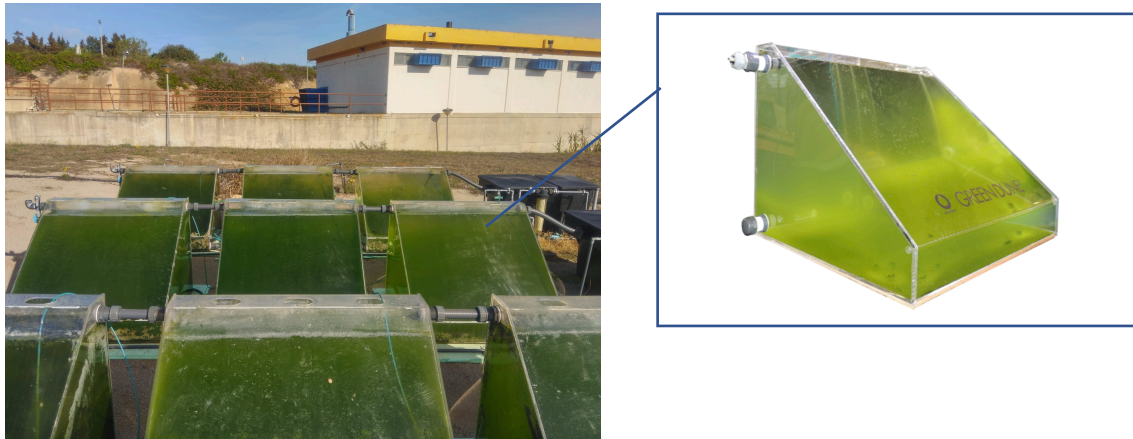


Figura 1 - Sistema de reatores GreenDune® instalado na ETAR da Quinta do Lago, Faro, ao abrigo do projeto GreenTreat (Adaptado de: [Bluemater](#), 2021)

1.5. Suplementação e biofixação de CO₂ nos sistemas de tratamento por microalgas

Nos sistemas de tratamento terciário, os consórcios são dominados por espécies fotoautotróficas e mixotróficas, devido à baixa presença de matéria orgânica para o crescimento bacteriano (Gouveia, 2011). As microalgas através da radiação luminosa, juntamente com os nutrientes (compostos azotados e fosfatos e CO₂ dissolvidos no meio), desenvolvem-se e multiplicam-se, realizando fotossíntese. Desta forma, biofixam o CO₂, produzindo O₂ e biomassa (Figura 2) (Acién *et al.*, 2016). A disponibilidade de CO₂ está diretamente relacionada com o crescimento, produção de biomassa microalgal, ou seja, multiplicação celular e enriquecimento de compostos nas células formadas. Este gás pode estar naturalmente dissolvido no meio de cultura a partir de fonte atmosférica; estar presente a partir de transformações químicas, por parte de bactérias heterotróficas, ou, por outro lado, ser injetado artificialmente de modo a incrementar o crescimento da cultura e o enriquecimento da mesma.

Nos consórcios onde as microalgas fotoautotróficas e mixotróficas são dominantes perante as bactérias heterotróficas, a carência de CO₂ na cultura pode ser limitativa para que estas realizem fotossíntese, se multipliquem de forma mais rápida e fixem o máximo de nutrientes possível do meio. Sendo que, nos tratamentos terciários de ARU o objetivo é

biofixar o máximo de nutrientes e compostos como metais pesados presentes nos efluentes, é necessário garantir que nenhum dos restantes fatores de crescimento seja limitado, como é caso dos níveis de CO₂. Este gás ao ser limitado leva a que as microalgas não consigam desenvolver-se de forma produtiva, por este não ser biofixado no Ciclo de Calvin (Figura 2) bloqueando o restante processo fotossintético e biofixação dos nutrientes (Rosenberg *et al.*, 2008; Acién *et al.*, 2016).

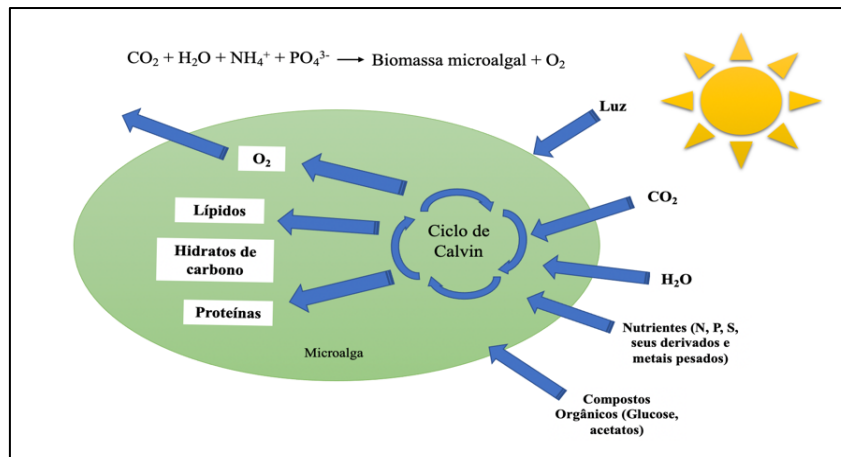


Figura 2 - Esquema simplificado da fotossíntese realizada pelas microalgas (adaptado de: Rosenberg *et al.*, 2008)

Por todas estas possibilidades de limitação e ineficiência dos sistemas de tratamento, em reatores abertos, a injeção/suplementação com CO₂, artificial ou de gases de combustão, apresenta-se como um dos fatores de melhoramento do rendimento dos sistemas, de modo a aumentar a produtividade de biomassa e, conseqüentemente, a taxa de fixação dos nutrientes por parte das microalgas (Pires *et al.*, 2012). Contudo, devido à elevada dissipação do gás em sistemas abertos, existem alguns sistemas onde são utilizadas câmaras de carbonatação que permitem, através de fluxo contracorrente, a melhor transferência de CO₂ para o meio na forma dissolvida (Park *et al.*, 2011).

Chinnasamy *et al.* (2008), assim como vários outros autores compararam, em reatores fechados, as taxas de biofixação de CO₂ em culturas monoalgais suplementadas por efluente. Determinaram os efeitos da concentração de CO₂ e da temperatura no crescimento da espécie *C. vulgaris*. Fizeram variar as concentrações de CO₂, num intervalo de 0,036 (concentração atmosférica de CO₂) a 20 %, sendo que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas com 6 % de CO₂, de 210 µg mL⁻¹, correspondendo a 20x mais do que o controlo com CO₂ atmosférico (Chinnasamy *et al.*, 2008). Kuo *et al.*, (2016) testaram, também, os efeitos da suplementação de CO₂, em águas residuais de aquacultura, sendo que ao suplementar com 2 e

4 % de CO₂ uma cultura de *Chlorella* sp. se obtiveram produtividades de aproximadamente 4,5 g L⁻¹, após 7 dias de cultivo, muito superior à cultura arejada apenas com ar atmosférico. Demonstraram assim a eficiência de tratamento aquando da suplementação com CO₂ (Kuo *et al.*, 2016).

Pode ainda ser possível reforçar a concentração de compostos na biomassa sub-produzida através da suplementação nutricional, como por exemplo, através da suplementação com CO₂. Esta suplementação leva ao aumento da taxa de multiplicação celular e consequentemente a uma necessidade de consumo dos restantes nutrientes. Desta forma, dá-se um aumento da taxa de remoção dos nutrientes, melhorando o tratamento, assim como uma maior produção de compostos valorizáveis (Arbib *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019).

1.6. Composição e valorização da biomassa produzida no tratamento de ARU

Os nutrientes presentes nas ARU, ou seja, compostos azotados e fosfatados, ao serem, juntamente com o carbono orgânico, biofixados pelas microalgas, são transformados pelas mesmas em constituintes da biomassa microalgal, resultantes como co-produto dos sistemas de tratamento. Estes compostos, fixados pelas microalgas, são transformados pelo seu metabolismo em lípidos, hidratos de carbono e proteínas, que conferem valor à biomassa produzida (Jiang *et al.*, 2011; Pires *et al.*, 2012). Podem ser produzidos, pelas microalgas, com valor comercial acrescentado, moléculas bioativas, como os carotenoides, ácidos gordos insaturados, enzimas, compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, vitaminas, entre outros compostos. Estes podem ser utilizados na alimentação, cosmética, na indústria farmacêutica, na produção de biomateriais num contexto de biorrefinaria e na produção de biocompostos para fertilização (Ferrell *et al.*, 2010; Satyanarayana *et al.*, 2011).

O aumento da produção de biomassa juntamente com o reduzido custo associado ao crescimento de microalgas utilizando elementos residuais de outros processos, permite obter produtos com um custo bastante inferior, tornando-os mais competitivos comercialmente, conforme a sua composição, tal como, biocombustíveis e biofertilizantes (Sturm & Lamer, 2011; Pires *et al.*, 2012; Pandey *et al.*, 2013). A partir da biomassa microalgal é possível obter biocompostos como proteínas, hidratos de carbono e lípidos que podem ser convertidos em biocombustíveis, como bioetanol, biogás e biodiesel, respetivamente (Morais *et al.*, 2016). No que concerne à produção de biofertilizantes, esta biomassa para além de ser fornecedora de fósforo, azoto, entre outros micro e macronutrientes, para o crescimento das plantas, possui

compostos que atuam como bioestimulantes (auxinas, giberlinas e citocinas), funcionando como fitohormonas naturais. O elevado conteúdo em microorganismos leva ainda a um aumento de biodiversidade, contrariamente ao que acontece com os fertilizantes de síntese prejudiciais ao ambiente (Collahuazo *et al.*, 2019).

Assim, contrariamente ao que acontece nos processos de tratamento convencionais, onde a produção de lamas é difícil de gerir, nos tratamentos por microalgas é possível valorizar economicamente e ambientalmente a biomassa produzida, dando-lhe um segundo destino e promovendo a economia circular.

1.7. Projeto GreenTreat

A criação de processos de tratamento mais ecoeficientes, pouco dispendiosos, eficientes no tratamento de efluentes com características variáveis, no menor TRH possível, faz com que sistemas de microalgas sejam uma opção aos sistemas aeróbios convencionais. Contudo, estes sistemas necessitam de estudo, em escala piloto, de modo a verificar o seu comportamento e viabilidade. Embora existam diversos estudos efetuados nos últimos anos, a sua aplicabilidade, devido aos custos dos reatores, de manutenção, as elevadas áreas de ocupação e o Tempo de Retenção Hidráulico (TRH) comparativamente com as taxas de remoção, é uma área de possível melhoramento, tanto ao nível de condições operacionais, como de design dos reatores, como em termos de eficiência (Acién *et al.*, 2016).

Em consequência, novos biorreatores, como os GreenDune[®] desenvolvidos pela empresa portuguesa de ecosoluções Bluemater, têm vindo a ser estudados de modo a melhorar os parâmetros de cultivo e eficiência de tratamento. Estes reatores possuem uma capacidade de 480 L m⁻², podendo ser ligados de forma sequencial de modo a diminuir o TRH, de acordo com o volume necessário a ser tratado, funcionando de forma ecológica e pouco dispendiosa, em relação aos processos de tratamento convencionais.

O grupo de biotecnologia marinha, MarBiotech, do Centro de Ciências do Mar (CCMAR), da Universidade do Algarve (UAlg), desenvolveu, juntamente com a empresa Bluemater, o projeto GreenTreat. O mesmo tem como fim o estudo e otimização dos parâmetros de cultivo, funcionamento e valorização da biomassa, do sistema piloto GreenDune[®] inserido na ETAR da Quinta do Lago, Faro, Portugal. Este grupo estuda o cultivo de microalgas há mais de 20 anos, realizando trabalhos relacionados com condições de cultivo em escala laboratorial e industrial (Pereira *et al.*, 2016; Schulze *et al.*, 2017). Além disso, tem estudado, em diferentes projetos, o cultivo de microalgas para tratamento de

diferentes efluentes como os resultantes da produção de suínos (ALGAVALOR), da aquicultura (GreenDune), agricultura (ALGACYCLE) e doméstico/urbano (GreenTreat).

Neste contexto, este trabalho, inserido no projeto GreenTreat, irá estudar o tratamento terciário de ARU domésticas, por blooms naturais de microalgas às escalas piloto e laboratorial. O estudo irá avaliar a influência de dois TRHs, em duas estações do ano, à escala piloto no sistema composto por reatores GreenDune[®], instalados na ETAR da Quinta do Lago, Algarve. Além disso, em laboratório, será realizado o tratamento terciário com bloom natural suplementado com CO₂ a fim de aumentar a produtividade celular do sistema e, consequentemente, a eficiência do tratamento.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo a otimização dos parâmetros operacionais, de cultivo e nutricionais (TRH e suplementação com CO₂) no cultivo de *blooms* naturais de microalgas para tratamento terciário de efluentes domésticos em escala piloto e laboratorial.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o melhor TRH para tratamento de ARU por *blooms* naturais de microalgas em reatores GreenDune® (escala piloto) em duas estações do ano (verão e outono);
- Determinar quais as aplicações possíveis para a biomassa produzida no sistema de cultivo à escala piloto, com vista à sua valorização;
- Melhorar, à escala laboratorial, a eficiência do tratamento terciário por um *bloom* natural de microalgas recorrendo à suplementação com CO₂.

3. Material e Métodos

As experiências do presente estudo, realizado ao abrigo do projeto científico GreenTreat (PTDC/BTA-BTA/31567/2017), desenvolvido pelo grupo de biotecnologia marinha, MarBiotech, do Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve (CCMAR), tiveram início em julho de 2020 e finalização em maio de 2021. O trabalho foi dividido em duas fases experimentais (Figura 3): i) uma fase à escala piloto, onde recorrendo ao sistema de reatores GreenDune® instalado na ETAR da Quinta do Lago (Algarve) (Figura 4a), foram testados dois TRH (1 e 2 dias), em duas campanhas, uma de verão (de 3 de agosto a 4 de setembro de 2020) e uma outra de outono (de 26 de outubro a 27 de novembro de 2020), que corresponderam a 4 semanas de experiência cada (8 dias de adaptação e crescimento; 12 dias de sistema em contínuo); ii) uma fase à escala laboratorial, onde foi testada, recorrendo a um sistema de biorreatores *bubble column* (Figura 4b), a influência da suplementação de CO₂ puro no cultivo/tratamento do mesmo efluente (secundário) utilizado no sistema piloto, em diferentes quantidades de modo a entender o seu benefício no tratamento em regime semi-contínuo. Para isso, foi realizado primeiramente uma experiência em descontinuo (*batch*), de modo a entender quais as melhores condições de CO₂ a utilizar e qual a melhor taxa de renovação (TRH) em sistema semi-contínuo.

Tanto na fase piloto como na fase laboratorial foram utilizados *blooms* naturais constituídos por consórcios microalgais, criados a partir das espécies naturalmente presentes no efluente utilizado. Assim, em cada uma das experiências existiram fases de adaptação dos *blooms* aos sistemas, de aproximadamente 1-2 semanas.

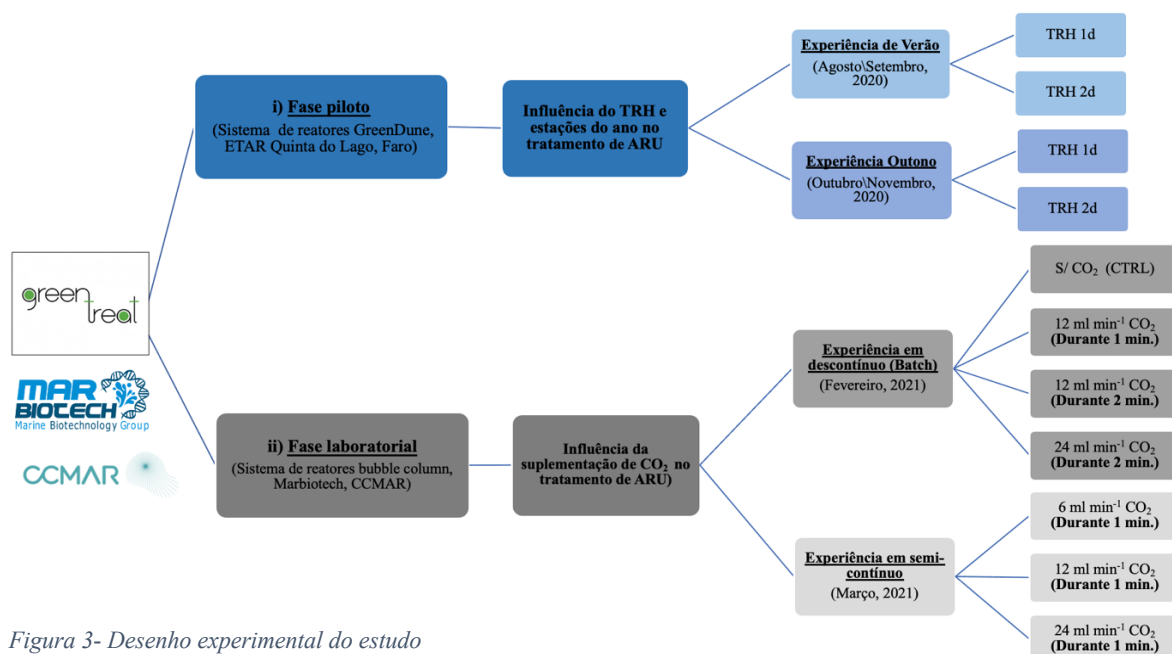


Figura 3- Desenho experimental do estudo

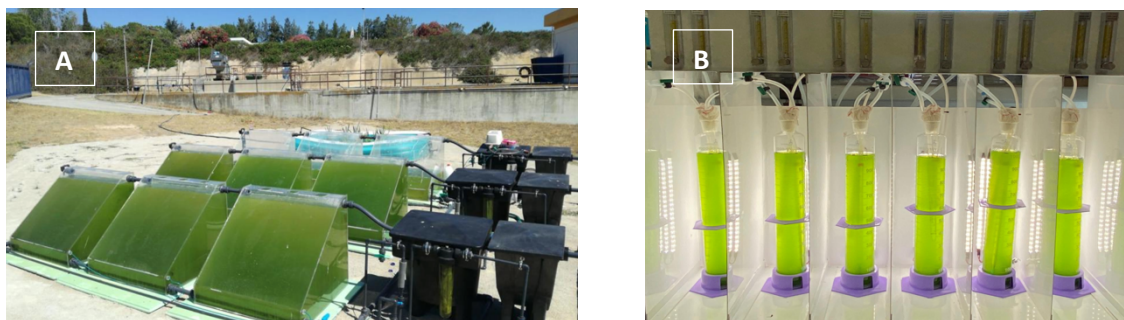


Figura 4 - Sistema de reatores utilizado nas duas fases do estudo: A) Fase i), Sistema piloto de reatores GreenDune[®] instalados na ETAR Quinta do Lago; B) Fase ii) reatores Bubble column

3.1. Cultivo/tratamento em escala piloto

Para o cultivo das experiências em escala piloto, realizadas na fase i), foi utilizada uma linha de 3 reatores GreenDune[®], de 480 L de volume útil cada (totalizando 1440 L), ligados em contínuo, do sistema de reatores instalado na ETAR da Quinta do Lago (Figura 5).

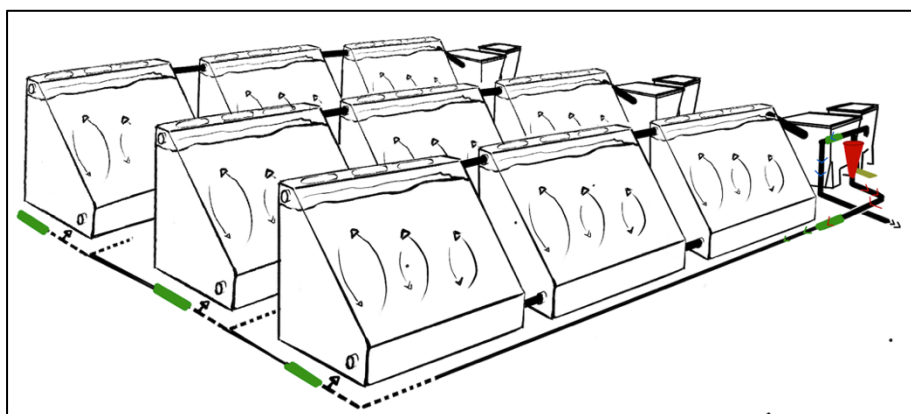


Figura 5 - Esquema do sistema de reatores GreenDune[®] instalado na ETAR Quinta do Lago ao abrigo do projeto GreenTreat (Cerqueira, 2020).

Para ambas as campanhas (verão e outono), iniciou-se pela limpeza e adaptação do *bloom* ao sistema, utilizando o efluente de trabalho (efluente secundário da referida ETAR), bombeado a partir da entrada dos reatores BioFOR[®] em uso na ETAR, recorrendo a uma bomba hidráulica submersível (AquaFORTE, AF250). Após esta limpeza, os reatores foram cheios com o efluente a tratar e deixados adaptar naturalmente, às condições atmosféricas, durante aproximadamente 7 dias, mantendo o sistema em arejamento contínuo com um compressor de ar (AIRLAB, EV120). Após 7 dias de adaptação, foi fixado o caudal de entrada de forma a obter o TRH a testar (1 e 2 dias), respetivamente. Este caudal foi calculado

a partir da razão entre o volume dos reatores (V), de 1440 L (3 reatores de 580 L ligados sequencialmente), e o caudal a utilizar (Q) (Equação 1), que define o caudal em $L h^{-1}$ de entrada do sistema, que para 1 dia será de $50 L h^{-1}$ e para 2 dias de $25 L h^{-1}$.

$$TRH = \frac{V}{Q} \quad (1)$$

Após adaptação e crescimento do *bloom*, em ambas as campanhas e para ambos os TRH testados, foram realizadas amostragens de: efluente de entrada do sistema (E); efluente de saída, ou seja, efluente tratado (T); biomassa sedimentada no tanque de sedimentação (BM) e amostra dos cultivos dos 3 reatores ligados sequencialmente.

As amostras recolhidas serviram para análise diária dos seguintes parâmetros:

- 1) Concentração celular, obtida através de leitura por densidade ótica, espectrofotometria em leitor de placas de 96 poços (Biotek, Synergy 4);
- 2) pH e temperatura, obtidas in situ através de sonda (Hanna instruments, HI 83141);
- 3) Concentração de nutrientes (N_T , P_T , NH_4^+ , NO_3^- ; PO_4^{3-} ; CQO), através da utilização de Kits comerciais (Merck, Supelco), para as amostras E e T;
- 4) Sólidos Suspensos Totais (SST), através de pesos secos.

A cada amostragem, a biomassa retirada do sedimentador foi centrifugada e armazenada a $-20^\circ C$ para ser analisada, posteriormente de forma composta, quanto à sua composição proximal, para cada TRH testado, em cada campanha (teor em lípidos, humidade, cinzas, proteínas, hidratos de carbono e análise elementar de CHN) (Figura 6).

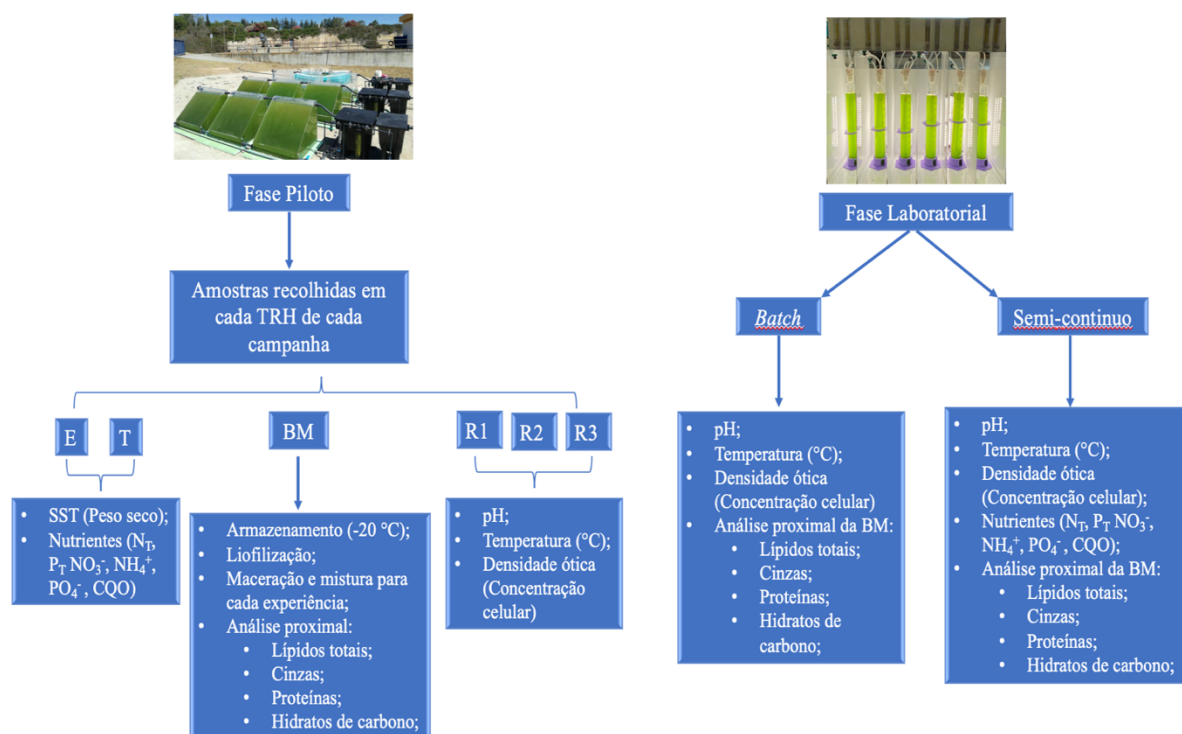


Figura 6 - Esquema laboratorial das análises efetuadas para cada fase experimental. (E) amostra de Entrada; (T) amostra de efluente Tratado; (BM) Biomassa recolhida; (R1) amostra do Reator 1; (R2) amostra do Reator 2; (R3) amostra do R3.

3.2. Cultivo/tratamento em escala laboratorial

O efluente, após tratamento secundário, recolhido na ETAR da Quinta do Lago, foi previamente caracterizado, ao nível da sua composição em nutrientes e pH, e inoculado em biorreatores *bubble column* de 1 L de volume útil (Figura 4B), suplementado com meio de cultivo BG-11 diluído a 50 % e estabilizado durante aproximadamente 7 dias para produção do *bloom* natural que serviu como inóculo para as experiências em descontínuo e semi-contínuo.

3.2.1. Cultivo descontínuo (batch)

Após estabilização, o inóculo foi diluído a 30 % em efluente secundário, previamente caracterizado e afinado a 20 mg L⁻¹ (NH₄⁺). Os cultivos foram realizados em reatores airlift sob condições controladas de luz LED (105 μmol m⁻² s⁻¹) e temperatura ambiente (aprox. 25 °C) com fotoperíodo de 12h:12h e arejamento constante promovido por bomba de ar (4 ml min⁻¹) (AIRLAB, EV120). O CO₂ puro (100%) foi injetado nas seguintes condições: 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto; e 12 e 24 ml min⁻¹, durante 2 minutos, a cada 60 minutos na etapa clara da fotossíntese. Para isso, recorreu-se a uma botija equipada com uma válvula solenoide, ligada a um timer, que de 60 em 60 minutos da fase clara do fotoperíodo provocava a injeção

durante o tempo definido. As injeções foram realizadas através de pedras porosas para melhor difusão do gás no meio. Foi realizado um cultivo sem adição de CO₂, que serviu de controlo. As experiências foram conduzidas em duplicado, sendo realizadas até à fase estacionária de crescimento (aproximadamente 12 dias) e diariamente recolhidas amostras para avaliação da concentração celular e monitorização do pH das culturas. O volume foi diariamente ajustado com adição de água destilada esterilizada, devido às perdas por evaporação.

Através da curva de crescimento obtida, calculou-se o TRH mais adequado ao sistema através do modelo de Verhulst (Equação 2). Este relaciona a concentração de biomassa no tempo (X), com a sua concentração inicial (X_0), com o máximo de concentração alcançada em *batch* (X_m) e com a taxa de crescimento específico (μ) (h^{-1}). A partir deste cálculo é determinada a taxa de crescimento específico (μ) (h^{-1}), obtendo-se através da equação 3 a taxa de renovação diária (θ), ou seja, o TRH mínimo para prevenir *washout* da biomassa nos reatores (Equação 3) (Ruiz *et al.*, 2013).

$$X = \frac{X_0 * X_m * e^{\mu * t}}{X_m - X_0 + X_0 * e^{\mu * t}} \quad (2)$$

$$\theta_{min.} = \frac{1}{TRH} \quad (3)$$

X – concentração de biomassa obtida no instante t ($mg L^{-1}$);
 X_0 – concentração de biomassa inicial ($mg L^{-1}$);
 X_m – concentração de biomassa máxima atingida em *batch* ($mg L^{-1}$);
 μ – taxa específica de crescimento (h^{-1});
TRH – Tempo de Retenção Hidráulico (d);
 $\theta_{min.}$ – taxa de renovação diária ($L d^{-1}$)

3.2.2. Cultivo semi-contínuo

Após determinação do TRH a utilizar em cultivo semi-contínuo (θ), a partir do modelo de Verhulst (em 3.2.1), deu-se início ao cultivo nos mesmos reatores e condições, à exceção das condições de injeção de CO₂. A injeção de CO₂ foi feita em duplicado, onde perante os resultados obtidos no cultivo em *batch* e os cálculos realizados, com base no modelo de Verhulst, se percebeu que as melhores condições a testar seriam de 6; 12 e 24 ml min^{-1} , durante 1 minuto a cada 60 minutos, na etapa clara da fotossíntese.

Diariamente, neste cultivo foram avaliados o pH e concentração celular. Para o tempo determinado pelo melhor TRH (definido em 3.2), foi feita uma renovação diária do efluente, a uma taxa de $1/TRH L d^{-1}$ (Equação 3). O volume recolhido a cada renovação foi utilizado para

análise de nutrientes (N_T , P_T , NH_4^+ , NO_3^- ; PO_4^{3-} ; CQO), através de kits comerciais (Merck, Supelco), e para observação ao Microscópio Ótico Composto (MOC) (Motic BA-310) para avaliação da variação e qualidade do consórcio de microalgas presente na cultura. Posteriormente, armazenou-se e foi liofilizada, a biomassa obtida, para análise composta da sua composição proximal (descrito em 4.3.3).

3.3. Análise laboratorial das amostras

3.3.1. Concentração de biomassa e pH

Para ambas as experiências (3.1 e 3.2) foram medidas as densidades óticas (DO) como método para interpolação da concentração celular dos cultivos em $g L^{-1}$. A análise realizou-se através de uma curva de calibração, para cada experiência, que relaciona o peso seco (concentração em $g L^{-1}$) e densidade ótica (750 nm) determinada em leitor de placas (Figura 7).

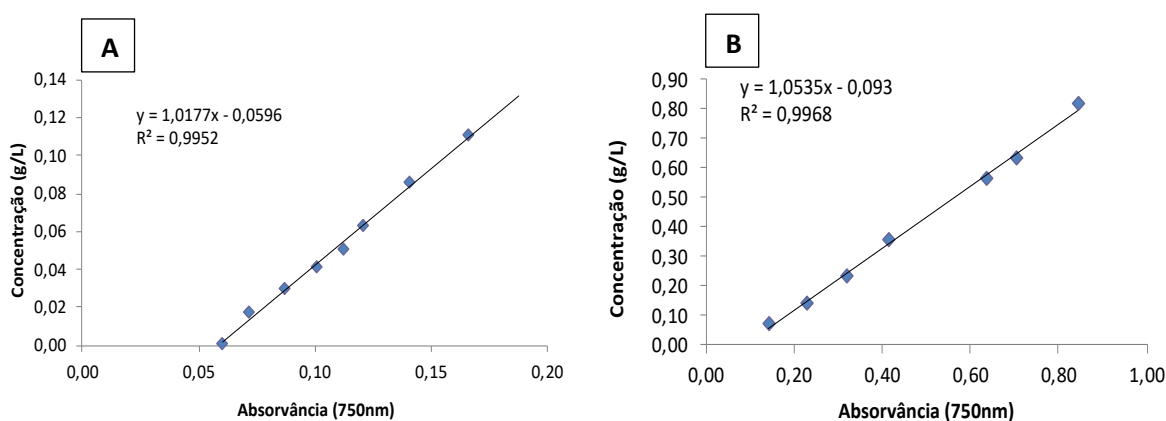


Figura 7 - Curvas de Calibração para obtenção da concentração de biomassa ($g L^{-1}$) através de densidade ótica (DO), (A) para a experiência em piloto (3.1) e (B) para a experiência em escala laboratorial (3.2).

Para a obtenção das curvas foram utilizadas amostras dos inóculos iniciais após adaptação, onde se realizaram diluições de 1 a 10 vezes. Estas foram filtradas em membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu m$), anotando o volume filtrado (ml) e colocadas a secar, em estufa, a $100 \text{ }^\circ C$ (BINDER, ED115), durante a noite. Após a secagem, foram colocadas em exsiccador durante 20 min e pesadas numa balança analítica (AND, GH-202, $d=0,01/0,1 \text{ mg}$). Recorrendo às mesmas amostras, estas foram lidas em leitor de placas de 96 poços a 750 nm, de modo a correlacionar a concentração em $g L^{-1}$, obtidas a partir dos pesos secos (Equação 4), com a densidade ótica. Todas as medições realizadas foram feitas em triplicado.

Após a obtenção das equações das respectivas curvas de calibração ($y = 1,0177x - 0,0596$; $y = 1,0177x - 0,0596$) foi possível ao longo das experiências a partir da medição diária da DO de cada amostra, ou seja, da sua absorvância a 750 nm (x), interpolar a respectiva concentração (y) (g L^{-1}).

Quanto ao pH, o mesmo foi determinado através de uma sonda (Hanna instruments, HI 83141), utilizada, também, para medir a temperatura dentro dos cultivos realizados em escala piloto *outdoor* (3.1).

$$C = \frac{m}{\frac{V}{1000}} \quad (4)$$

C – concentração de biomassa obtida através de peso seco (g L^{-1}),

m – massa de biomassa seca obtida (g)

V – volume de amostra filtrado (ml)

3.3.2. Análise do efluente e da água tratada

Na análise das amostras de efluente de entrada (E) e tratado (T), em ambas as experiências (3.1 e 3.2), foram realizadas análises de nutrientes, através de Kits comerciais (Merck, Supelco), para: Amónia (NH_4^+); Nitratos (NO_3^-); Azoto total (N_T); Carência Química de Oxigénio (CQO) e Fosfatos (PO_4^{3-}) e do método do ácido ascórbico para Fósforo total (P), de modo a calcular as taxas de remoção de cada tratamento.

Os Sólidos Suspensos Totais (SST), foram determinados para a experiência 3.1, através da filtração por membranas de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$), onde foram filtrados 50 ml de amostra, em triplicado, e colocadas a secar, em estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (BINDER, ED115), durante a noite. Após a secagem, foram colocadas em exsiccador durante 20 min e pesadas (AND, GH-202, $d=0,01/0,1 \text{ mg}$). Sendo assim possível, por diferença de massas (g) e dividindo pelo volume de amostra (L), obter a concentração de SST (g L^{-1}) nas amostras (Equação 4).

3.3.3. Composição da biomassa microalgal

A biomassa microalgal produzida e recolhida, tanto na experiência 3.1 como em 3.2, foi centrifugada em tubos de centrifuga de 50 ml, a 5000g, durante 5 min, à temperatura ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (ThermoScientific, Heraeus Megafuge 16R) e

armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, de modo a ser liofilizada (Telstar, LyoALFA). Após a liofilização, macerou-se em amostras compostas pelas biomassas recolhidas diariamente para cada TRH testado, com o objetivo de proceder à sua análise bioquímica (conteúdo em lípidos totais, proteínas, hidratos de carbono e cinzas) e elementar para Carbono (C), Hidrogénio (H) e Azoto (N).

3.3.3.1. Lípidos totais

O conteúdo em lípidos totais das diferentes biomassas foi quantificado pelo protocolo descrito por Bligh e Dyer *et al.* (1959). O mesmo baseia-se na extração de lípidos, após lise celular e extração com uma mistura de metanol, clorofórmio e água (Equação 4). Para a análise foram utilizados tubos de pesagem de 1 ml, previamente secos a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas e de seguida colocados em exsiccador (20 min.) e pesados/tarados (mg) em balança de precisão (P_i). Em tubos de extração com rosca pesou-se cerca 30 mg de biomassa seca ($m_{biomassa}$) e adicionou-se 0,8 ml de água destilada, deixando a amostra amolecer durante cerca de 20 minutos. Após este tempo executaram-se várias etapas, todas elas no interior da câmara de extração e de forma sequencial: 1) adição de 2 ml de metanol e 1 ml de clorofórmio; 2) homogeneização, em banho de gelo, durante 60 segundos em Ultraturrax (IKA®, T18 digital ULTRA TURRAX®); 3) adição de 1 ml de clorofórmio e homogeneização, em banho de gelo, durante 30 segundos em ultraturrax; 4) adição de 1 ml de água destilada e nova homogeneização durante 30 segundos. Após estas etapas de adição dos componentes, seguiu-se novamente em conjunto, a centrifugação das amostras a 2500g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, para separação das fases. De seguida, com uma pipeta de Pasteur extraiu-se a fase de clorofórmio para tubos de extração vazios, de onde se pipetou um volume conhecido ($V_{clorofórmio\ evaporado}$), no máximo 700 μl , para os tubos de pesagem. Posteriormente, estes foram colocados em banho seco ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) (VWR, Digital Heatblock) durante a noite, de modo a evaporar todo o clorofórmio, e pesados no dia seguinte, após 20 minutos no exsiccador, de modo a determinar o seu peso final (P_f). Após a evaporação do clorofórmio dos tubos de pesagem, o único resíduo que permanece nos tubos de pesagem são os lípidos totais extraídos. Desta forma, a partir do volume de clorofórmio evaporado, do volume total utilizado no protocolo (2 ml), da massa de biomassa adicionada e da diferença de peso obtida antes e após a evaporação do mesmo, é possível calcular a percentagem de lípidos totais presentes na amostra (Equação 5).

$$\text{Lípidos totais (\%)} = \frac{(P_f - P_i) \times V_{\text{cloroformio total}}}{V_{\text{cloroformio evaporado}} \times m_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad (5)$$

$(P_f - P_i)$ – diferença de peso dos tubos de pesagem antes e após a extração (mg),

$V_{\text{cloroformio total}}$ – volume de cloroformio utilizado no protocolo (2 ml)

$V_{\text{cloroformio evaporado}}$ – volume de cloroformio pipetado para os tubos de pesagem (máx. 0,7 ml)

m_{biomassa} – massa de biomassa utilizada na análise (mg)

3.3.3.2. Proteínas

De modo a quantificar o conteúdo em proteínas e em hidratos de carbono da biomassa obtida, foram previamente realizados para ambas as análises, extratos a partir da biomassa seca obtida após liofilização. Para preparação dos extratos, pesou-se 5 mg de cada amostra (em triplicado) em tubos eppendorf de 1,5 ml, onde se adicionou microesferas de vidro (*glassbeads*) até perfazer 0,5 ml e 1 ml de água destilada. De seguida, levaram-se os tubos a agitar em moinho horizontal (Retsh, MM 400), durante 5 min a 30 Hz, para induzir lise celular e extrair os conteúdos intracelulares a analisar. Após este processo, o sobrenadante foi retirado, com a ajuda de uma micropipeta, para tubos Falcon de 15 ml e aferidos com água destilada até 10 ml.

Para a análise de proteínas, foi utilizado o método descrito por Lowry *et al.* (1951), que se baseia na absorção a 750 nm, de um composto azul-acinzentado produzido a partir da mistura, contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Folin-Ciocalteu), que se reduz ao reagir com as proteínas, na presença do catalisador cobre (II). Para a quantificação da concentração de proteínas, realizou-se uma curva de calibração ($y = 555,25x + 4,8444$), tendo como padrão Albumina Soro de Bovino (BSA) (Figura 8). Para a realização da curva preparou-se uma solução stock de 2 mg ml⁻¹ de BSA (0,4 g de BSA colocado a secar em estufa a 60 °C, durante a noite, em 200 ml de água destilada), onde a partir desta se diluiu para as seguintes concentrações (5, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 300 e 400 µg ml⁻¹). De seguida, procedeu-se à realização do protocolo utilizando as soluções de diferentes concentrações como amostra.

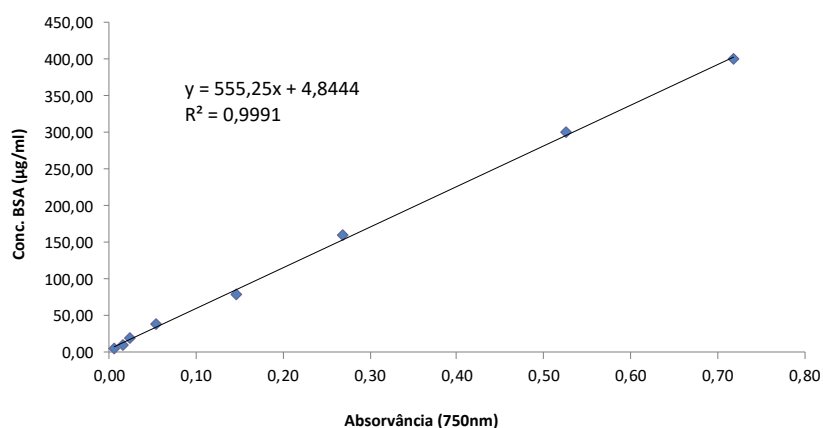


Figura 8 - Curva de calibração (BSA) para método Lowry et al. (1951).

O protocolo foi realizado em triplicado, incluindo um branco realizado com água destilada. Para a realização do método utilizou-se tubos de vidro com tampa de rosca, onde se adicionou 0,5 ml de amostra (extrato) e 0,5 ml de NaOH 1N, seguindo-se a colocação, durante 5 minutos, em banho-maria a 100 °C e o seu arrefecimento em banho de gelo por 10 minutos. Adicionou-se 2,5 ml da solução C (50 ml de solução a 5 % de Na₂CO₃ e 2 ml de solução de 0,5 % de CuSO₄.5H₂O em 1 % de tartarato de sódio e potássio), seguindo-se de agitação. Após esta adição, os tubos foram mantidos em repouso por 10 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 ml da solução de Folin-Ciocalteu a 1N e a colocação dos mesmos no escuro durante 30 minutos. Concluído o tempo anterior, as amostras foram lidas em espectrofotómetro de placas a 750 nm. Todos os passos foram realizados tendo em atenção o tempo, de forma que todas as amostras respeitem o tempo de repouso e de escuro.

Após a leitura das absorvâncias a 750 nm, estas foram substituídas na curva de calibração (x) realizada de modo a determinar o valor de concentração das proteínas solúveis, em µg ml⁻¹(y).

3.3.3.3. Hidratos de carbono

Para a realização da análise de hidratos de carbono, foi utilizado o método descrito por DuBois *et al.* (1956), que se baseia na produção de um composto amarelo-alaranjado, de absorção máxima de 488 nm, produzido a partir da reação dos hidratos de carbono e os seus derivados com fenol e ácido sulfúrico concentrado. Para esta análise, foi realizada uma curva de calibração ($y = 0,0041x - 0,0078$), utilizando como padrão a glicose (Figura 9). Para a elaboração da curva preparou-se uma solução stock de 1 mg ml⁻¹ de glicose (0,5 g de glicose

colocada a secar em estufa a 60 °C, durante a noite, em 500 ml de água destilada), onde a partir desta se diluiu para as seguintes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 µg ml⁻¹). De seguida, procedeu-se à realização do protocolo utilizando as soluções de diferentes concentrações como amostra.

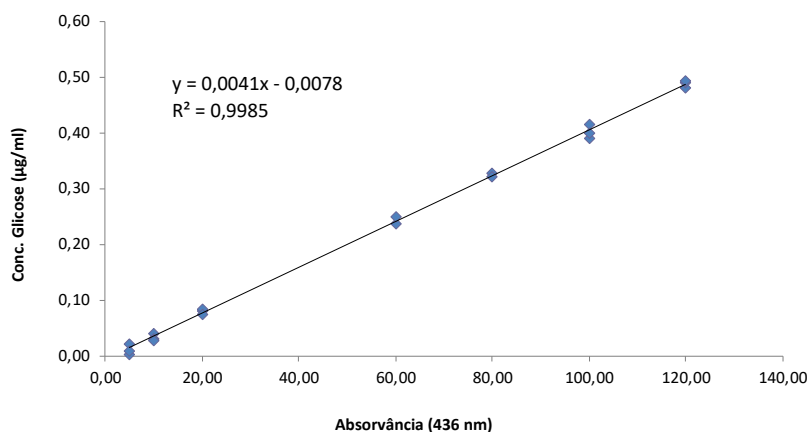


Figura 9 - Curva de calibração (glicose) para método DuBois et al. (1956).

O protocolo foi realizado em triplicado, incluindo um branco realizado com água destilada. Para a realização do método utilizou-se tubos de vidro com tampa de rosca, onde se adicionou 1 ml de amostra (mesmo extrato utilizado para a determinação do conteúdo de proteínas em 3.3.3.1) e 1 ml da solução de fenol a 5 %, agitando. De seguida adicionou-se, recorrendo a um dispensador (EASY 20R+), 5 ml de H₂SO₄ a cada tubo, agitando por inversão com bastante precaução. Seguindo-se a colocação em repouso durante, exatamente, 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 20 minutos, de modo a interromper a reação. Finalmente, recorrendo a um fotómetro (Macherey-Nagel, PF-12 Plus) as amostras foram lidas, no interior dos mesmos tubos, a 460 nm, sendo este o comprimento de onda para a cor amarela.

Após a leitura das absorvâncias (x), estas foram substituídas na curva de calibração ($y = 0,0041x - 0,0078$), realizada de modo a determinar o valor de concentração de hidratos de carbono, em µg ml⁻¹ (y). Todos os passos foram realizados tendo em atenção o tempo, de forma que todas as amostras respeitem o tempo de repouso/reação.

3.3.3.4. Cinzas e Humidade

Conforme a *Association of Official Analytical Chemists - AOAC* (2000), realizou-se os métodos para determinação da percentagem de humidade e cinzas.

A biomassa seca foi determinada a partir da diferença de massa (mg), de aproximadamente 50 mg de biomassa liofilizada inicial, colocada a secar a 100 °C em cadinhos de porcelana, numa estufa de secagem (BINDER, ED115). Previamente, colocou-se durante 12h na estufa a 100 °C. De seguida foram deixados a arrefecer (20 min.) em exsicador e pesados numa balança analítica, para a determinação da sua tara. Após este procedimento, pesou-se cerca de 50 mg de biomassa liofilizada, anotando-se o valor (mg), colocou-se a secar na estufa a 100 °C até estabilizar o seu peso (peso seco). Desta forma, através da diferença de massas (massa inicial e massa final/seca) é possível obter-se a percentagem de biomassa seca em cada amostra analisada (Equação 6). Sendo esta análise feita em triplicados analíticos, servindo a percentagem final para o desconto nas restantes análises (Equação 7) onde se considera apenas a massa correspondente à biomassa seca (sem humidade).

$$\text{Biomassa seca (\%)} = \frac{m_f \times 100}{m_i} = \frac{(m_{fm} - m_c) \times 100}{m_i} \quad (6)$$

$$\text{Biomassa seca deduzida (mg)} = \frac{m_{medida} \times \text{Biomassa seca (\%)}}{100} \quad (7)$$

Biomassa seca – massa de biomassa seca determinada após processo de secagem (mg)

Biomassa seca deduzida – massa de biomassa seca deduzida após cálculo, para cada análise (mg)

m_{fm} – massa final medida após o processo de secagem, ou seja, massa do cadinho mais biomassa (mg)

m_c – massa/tara do cadinho vazio (mg)

m_f – massa de biomassa após o processo de secagem (mg)

m_i – massa de biomassa inicial colocada no processo de secagem (mg)

m_{medida} – massa de biomassa utilizada para cada análise (mg)

Quanto à análise para determinação da percentagem de cinzas, os cadinhos foram previamente numerados e colocados durante 15 min. a 560 °C, em forno mufla (JP-SELCTA®, SEL-HORN “R-8 L”), deixados arrefecer (20 min.) em exsicador e tarados/pesados em balança de precisão. De seguida, utilizando a mesma biomassa restante do processo de humidade (cerca de 50 mg de biomassa liofilizada) colocou-se de novo na mufla a 560 °C, durante 8 horas, para queimar toda a matéria orgânica presente na amostra de biomassa. De seguida, são postos a arrefecer até à temperatura ambiente, em exsicador e

pesados. Desta forma, sabendo a massa inicial de biomassa pesada (m_i), que corresponde à biomassa final obtida no processo de humidade, a tara do cadinho (m_c) e a massa final de biomassa após a queima (m_f), determina-se a quantidade de cinzas que restou, considerando que a 560 °C apenas restam cinzas e que toda a matéria orgânica é degradada (Equação 8).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_f \times 100}{m_i} = \frac{(m_{fm} - m_c) \times 100}{m_i} \quad (8)$$

m_c – massa/tara do cadinho vazio (mg)

m_f – massa de biomassa após o processo de queima (mg)

m_i – massa de biomassa inicial colocada no processo de queima (mg)

m_{fm} – massa final medida após o processo de queima, ou seja, massa do cadinho mais cinzas (mg)

3.4. Análise estatística dos dados

Os dados de composição da biomassa obtidos na experiência piloto, assim como os de composição da biomassa da experiência laboratorial, foram comparados e as diferenças significativas obtidas através da análise de variância ANOVA, em software *Statistica 7*, usando o teste de Tukey, a 95 % de confiança. Quanto aos dados de remoção de nutrientes da experiência piloto, por não apresentarem distribuição normal, foram comparados através do mesmo sistema informático e do teste de Mann-Whitney, também a 95 % de confiança.

4. Resultados e Discussão

4.1. Experiência piloto

4.1.1. Tratamento de ARU

Após a estabilização da concentração de biomassa no interior dos reatores, realizada para cada TRH, cada experiência teve uma duração de 12 dias de cultivo em contínuo, em ambas as campanhas (verão e outono). Através das amostras recolhidas de cada reator GreenDune (R1, R2 e R3), ligados em contínuo, foi possível, analisar vários fatores. Entre eles, a temperatura (°C) e pH, medidos in loco no interior dos reatores, e a concentração de biomassa, medida a partir de amostras recolhidas dos mesmos.

Através de dados obtidos pelas estações meteorológicas do IPMA, da zona de Faro, é possível denotar o aumento de temperatura do ar no verão ($T_{\min.} 20,0\text{ °C} - T_{\max.} 29,6\text{ °C}$) em relação à estação de outono ($T_{\min.} 13,7\text{ °C} - T_{\max.} 20,0\text{ °C}$), assim como a existência de um maior fotoperíodo e intensidade luminosa associados à estação de verão (IPMA, 2021). Contrariamente, no outono fez-se notar um período de elevada precipitação e desta forma um maior ensombramento (Figura 10). As microalgas, em geral, proliferam melhor em temperaturas inferiores a 30 °C (Suali and Sarbatly, 2012). No entanto, sendo esta experiência em *bloom* natural, o consórcio existente consegue adaptar-se a temperaturas ligeiramente mais elevadas (34 °C), não acontecendo o mesmo a temperaturas demasiado baixas (15 °C), assim como a fatores como menor fotoperíodo e menor intensidade luminosa (Figura 11). Este facto é verificado a partir dos dias 10 e 11 da campanha de outono, onde na presença de temperatura mais baixa (aproximadamente 15 °C) levou a uma produção de biomassa mais baixa, entre $3,2$ e $9,8\text{ mg L}^{-1}$ (Figura 11 e 12).

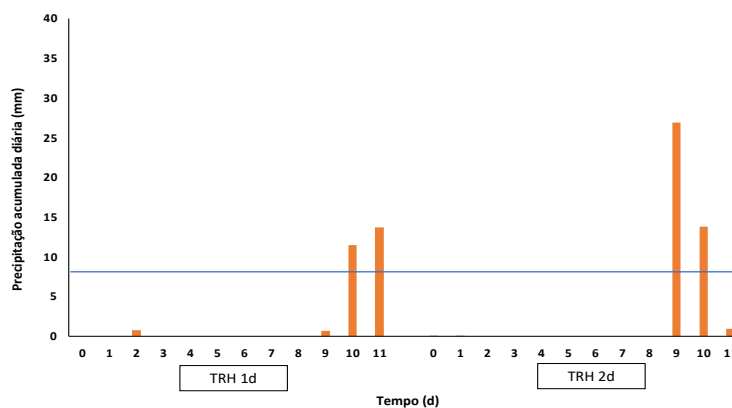


Figura 10 - Dados de precipitação acumulada diária (mm), durante a campanha de outono, para o TRH 1 e 2d. Média mensal de precipitação indicada pela linha azul (Adaptado de IPMA, 2021).

Nos gráficos A e B da figura 11, são apresentados os valores de temperatura medidos no interior dos reatores para as duas campanhas (A e B), onde se verifica a diferença de temperatura entre as mesmas, sendo superior no verão tal como a temperatura do ar (Figura 11).

A partir dos gráficos A e B da figura 12, correspondentes aos dados de concentração de biomassa obtidos para as duas campanhas (verão e outono, respetivamente), é possível denotar uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações médias de biomassa medidas no interior dos reatores nas duas estações do ano (verão: $35,9 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$; outono: $9,8 \pm 4,51 \text{ mg L}^{-1}$). Este facto deve-se a diversos fatores, entre eles, os fatores meteorológicos associados às condições de cultivo, enunciados anteriormente, como a temperatura, o fotoperíodo e a intensidade luminosa, que foram bastante superiores na campanha de verão (Richmond, 2004; Suali & Sarbatly, 2012). Contudo, também, a composição do efluente a tratar é um fator que diferencia a concentração de biomassa no interior dos reatores, entre as duas estações, uma vez que, no verão existe um maior número de residentes afetos à ETAR em causa, tal como se verifica através do aumento de caudal tratado pela ETAR no mês de Agosto (Figura 13). Este facto faz com que a concentração de nutrientes, principalmente NH_4^+ , a entrar no sistema seja superior e, desta forma, as microalgas tenham tido uma maior multiplicação e crescimento. Entre TRH, a concentração de biomassa (Figura 12) não apresenta diferenças significativas ($p > 0,05$), tanto na campanha de verão como na de outono, tendo como justificação a baixa diferença de retenção que existe entre os mesmos, tendo conseguido o sistema comportar-se de forma idêntica no seu crescimento. Este crescimento, relativamente ao que é comum em cultivo microalgal denota-se de concentrações bastante mais baixas (Razzak *et al.*, 2013), tendo como justificação a difícil determinação das mesmas devido aos biofilmes formados no interior dos reatores, na análise de densidade ótica. Nesta

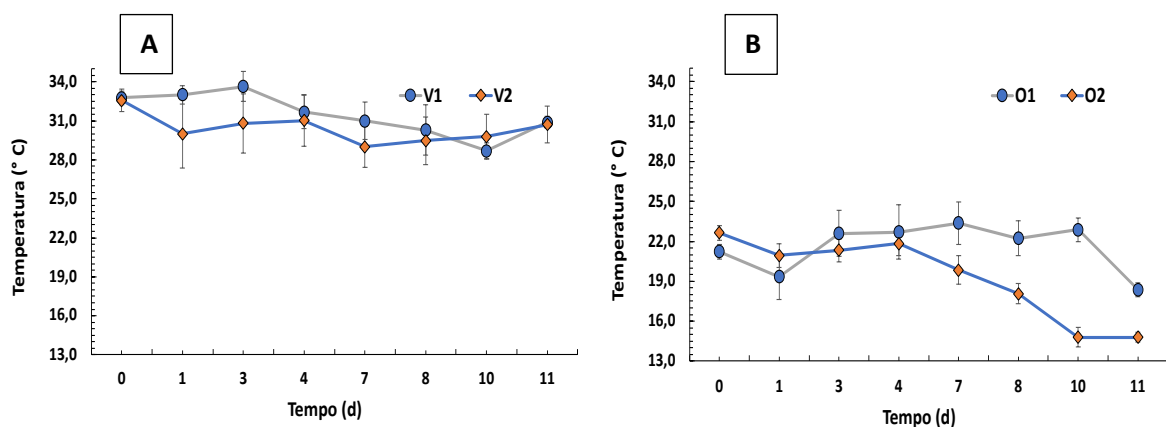


Figura 11 - Temperatura média(°C) medida no interior dos reatores, na campanha de (A) verão e (B) outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.

análise, os biofilmes, ao formarem aglutinações celulares, fazem com que o laser do equipamento, ao ultrapassar a amostra, encontre uma barreira, influenciando os resultados.

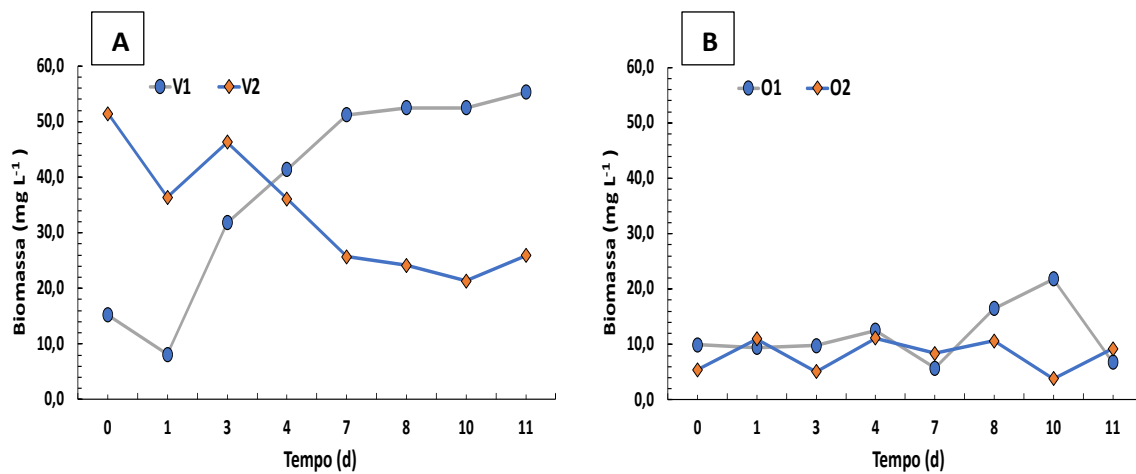


Figura 13 - Concentração de biomassa (mg L⁻¹) medidas a partir de densidade ótica das amostras recolhidas em cada campanha (A) Campanha de verão; (B) campanha de outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.

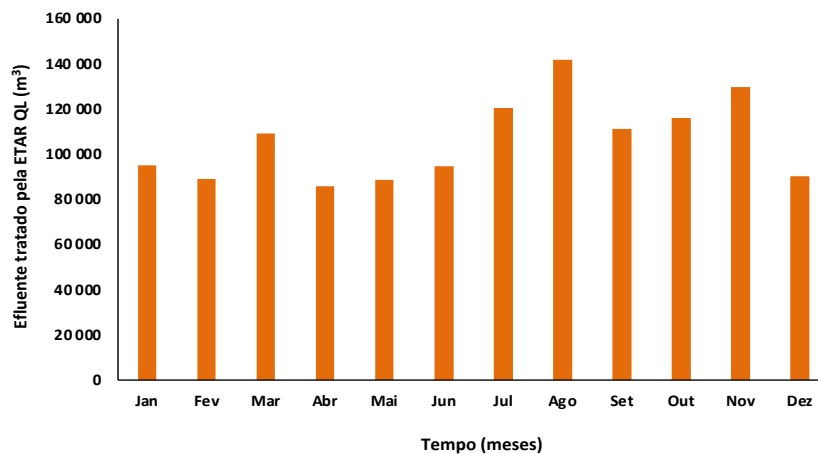


Figura 12 – Volume de efluente tratado pela ETAR da Quinta do Lago no ano 2020 (ADA, 2021).

No tratamento em causa, o consórcio composto por microalgas e bactérias, deveria equilibrar o pH, para valores entre os 7 – 9, pois as bactérias ao consumir matéria orgânica produziram CO₂ para o consumo pelas microalgas. Contudo, verifica-se através dos dados obtidos apresentados nos gráficos A e B da figura 14, valores de pH entre os 9,0 – 10,5 (Figura 14A e 14B), ligeiramente acima dos valores ótimos para o crescimento das microalgas, pH 7 – 9 (Pandey *et al.*, 2013). Sendo as concentrações de CQO, medidas no efluente de entrada, baixas, faz-se denotar a baixa presença de matéria orgânica no mesmo, fazendo com que o consórcio seja dominado por microalgas ao contrário do que acontece com as bactérias. Esta dominância provoca no meio uma carência de CO₂, devido ao consumo

deste gás ser superior, pelas microalgas, à produção por parte das bactérias, aumentando o pH do meio (Acién *et al.*, 2006). Estes dados de consumo de CO₂ explicam o crescimento das microalgas, numa fase inicial, uma vez que dominam o consórcio, consumindo CO₂ acima do produzido pelas bactérias, sendo este limitado ao longo do restante cultivo.

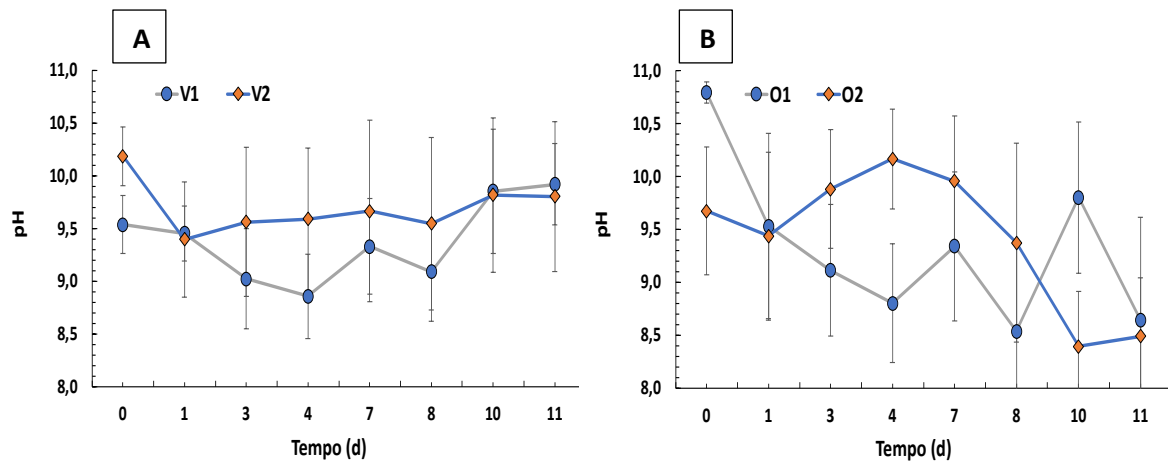


Figura 14 - pH médio medido no interior dos três reatores nas campanhas de (A) verão e (B) outono, onde (V1) campanha de verão TRH 1d; (V2) campanha de verão TRH 2d; (O1) campanha de outono TRH 1d; (O2) campanha de outono TRH 2d.

Perante os gráficos das figuras 15 e 16, onde se apresentam as concentrações de nutrientes presentes no efluente testado à entrada do sistema piloto (E), e do efluente tratado (T), medidas em cada dia ao longos das experiências, denota-se um cumprimento, em grande maioria, dos parâmetros legais (VLE) admitidos para a descarga de ARU da referida ETAR (Figura 15 e 16). Isto, pois, as concentrações da maioria dos nutrientes encontram-se abaixo dos VLE (delimitados a vermelho nos gráficos).

Em relação às concentrações de N total, detalhadas nos gráficos A e B da figura 15, verifica-se que estas são semelhantes em ambas as campanhas, à exceção do TRH 1d na experiência de outono. Nesta experiência (outono TRH 1d) foi onde foram obtidos o maior número de medições acima do VLE imposto para este nutriente (15 mgL⁻¹). Tendo na campanha de verão, o TRH 1d apresentado valores de N_T no efluente tratado abaixo do VLE, as mais baixas de entre as quatro experiências, apesar de apresentar a maior concentração na entrada, demonstrando assim a eficácia do sistema testado para a remoção deste nutriente.

Quanto à amónia, denota-se uma elevada concentração deste nutriente no efluente de entrada, na campanha de verão, para ambos os TRH, em relação à campanha de outono (Figura 15C e 15D). No entanto, apesar da entrada de concentrações elevadas de NH₄⁺ no sistema na campanha de verão, após tratamento, a concentração deste no tratado encontra-se

abaixo dos VLE, mostrando assim que o sistema consegue remover a amônia mesmo que em elevadas concentrações (Figura 15C).

Ao observar-se os gráficos das concentrações de N e NH_4^+ (Figura 15 A-D), verifica-se uma diferença significativa entre os valores do efluente a tratar entre estações. Sendo que na campanha de verão (Figura 15A e 15C) estes apresentaram maior concentração devido, provavelmente, ao aumento sazonal da população residente na área afeta à ETAR. Os volumes de efluente tratado pela ETAR, confirmam esta hipótese, devido a um maior caudal no mês de Agosto (Figura 13).

Quanto à concentração de NO_3^- , a mesma, para a campanha de verão em ambos os TRH, encontra-se abaixo dos VLE indicados na licença de descarga da ETAR da Quinta do Lago (50 mg L^{-1}), para o efluente à entrada, durante este período. Contudo, a partir da figura 15E, verifica-se a capacidade de fixação deste nutriente por parte do consórcio, embora em baixa quantidade, preferindo as microalgas o consumo de N na forma de amônia, pois, há um gasto energético para o consumo de NO_3^- (Barsanti e Gualtieri, 2014). Na campanha de outono verifica-se uma elevada concentração de NO_3^- no efluente à entrada, superior em mais de 50 % em relação ao verão, que pode ter ocorrido devido à elevada precipitação ocorrida neste período. Isto, pois, a lixiviação de compostos fosfatados e de nitratos associados, por exemplo, à fertilização dos campos de golfe e espaços envolventes à ETAR, para a rede de saneamento faz com que estas concentrações possam aumentar no sistema de tratamento (Figura 15F). Pela mesma razão, observa-se uma elevada concentração de fosfatos para a campanha de outono (Figura 16B). Para PO_4^{3-} não existem VLE, no entanto observa-se que o sistema é eficaz na sua remoção, pois as concentrações de tratado são inferiores às concentrações de entrada (Figura 16A e 16B). Esta remoção justifica-se pela necessidade de as microalgas usarem PO_4^{3-} para a produção de ATP, usado, por exemplo, na conversão de NO_3^- para NH_4^+ , como na produção de elementos celulares e no seu crescimento (Barsanti e Gualtieri, 2014).

No que diz respeito ao fósforo, observa-se a homogeneidade entre campanhas, não existindo grande variabilidade entre TRH. No entanto, nas duas campanhas, todas as concentrações do efluente a tratar encontram-se abaixo do VLE (10 mg L^{-1}), à exceção do 8º dia de outono para TRH 1d, devido a uma inconformidade no sedimentador secundário da ETAR, fazendo com que os SST aumentem no efluente, acompanhados de um aumento de P e matéria orgânica demonstrado pelo CQO (Figura 16 C-F). Apesar dos valores de P se encontrarem abaixo dos VLE, a sua síntese torna-se importante para a valorização da

biomassa produzida, pois este nutriente é essencial para o seu metabolismo, principalmente na síntese de fosfolípidos, de proteínas e ácidos nucleicos (Rawat *et al.*, 2011).

O CQO, embora não seja um nutriente, as suas concentrações indicam a quantidade de matéria orgânica presente no efluente, capaz ser oxidada. Desta forma, verifica-se, a partir dos gráficos E e F da figura 16, que apenas existiu uma entrada de maior quantidade de matéria orgânica nos primeiros quatro dias da campanha de verão. Nos restantes dias, incluindo a campanha de outono, os valores foram baixos, à exceção do dia 10 que obteve uma concentração de 1060 mg L⁻¹, devido a uma falha no sedimentador secundário da ETAR. Quanto às concentrações de CQO no tratado, estas foram superiores ao VLE (125 mg L⁻¹) na grande maioria dos casos durante a campanha de verão, devido à maior presença de células no sistema e à fraca retenção de SST no sistema de sedimentação (Figura 16E e 16F).

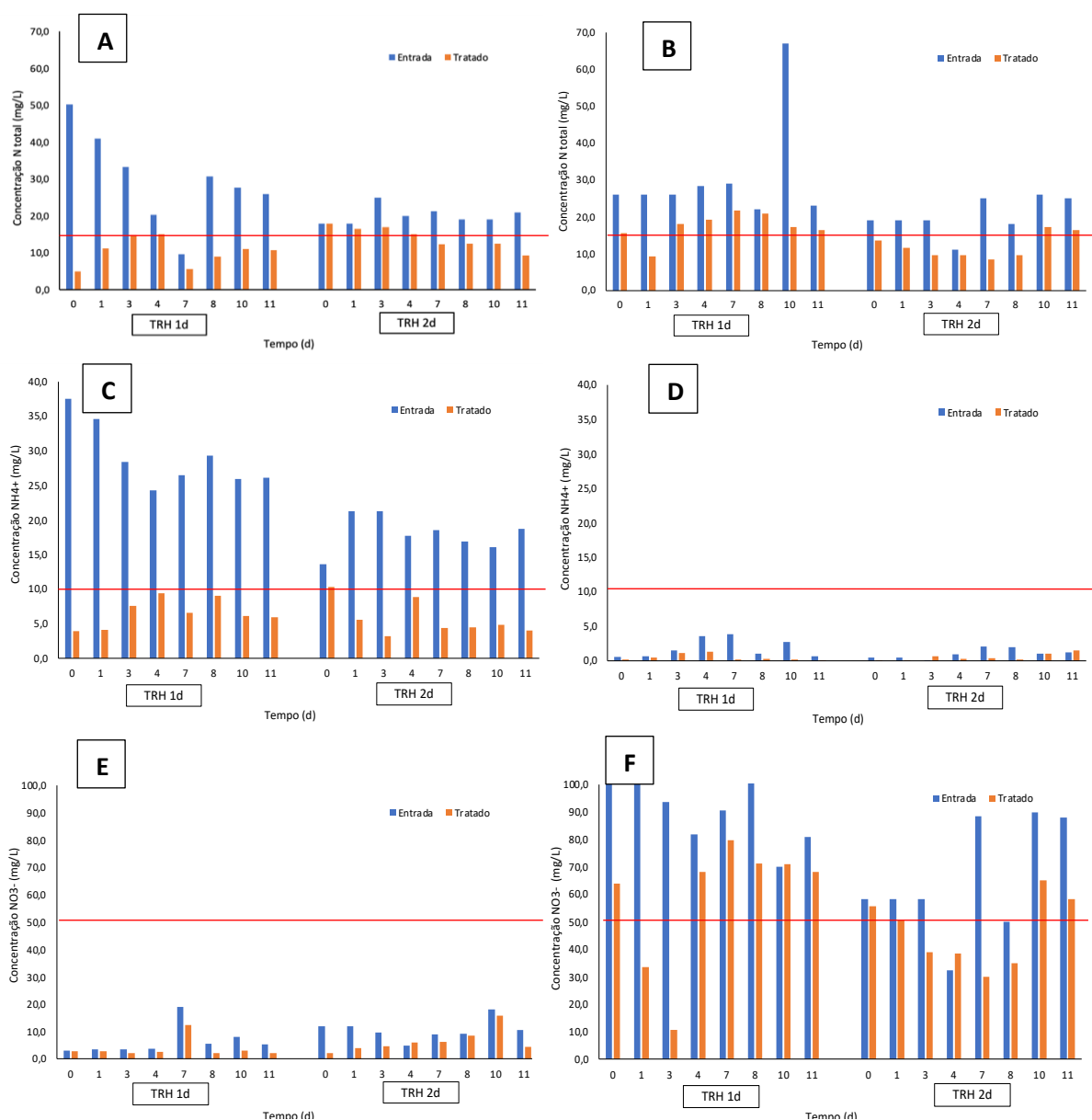


Figura 15 - Concentrações de N total; NO₃⁻ e NH₄⁺, no efluente de Entrada e no Tratado para (A; C; E) campanha de verão e (B; D; F) campanha de outono, para ambos os TRH (1 e 2d). A vermelho encontram-se os VLE para cada nutriente imposto pela licença de descarga da ETAR.

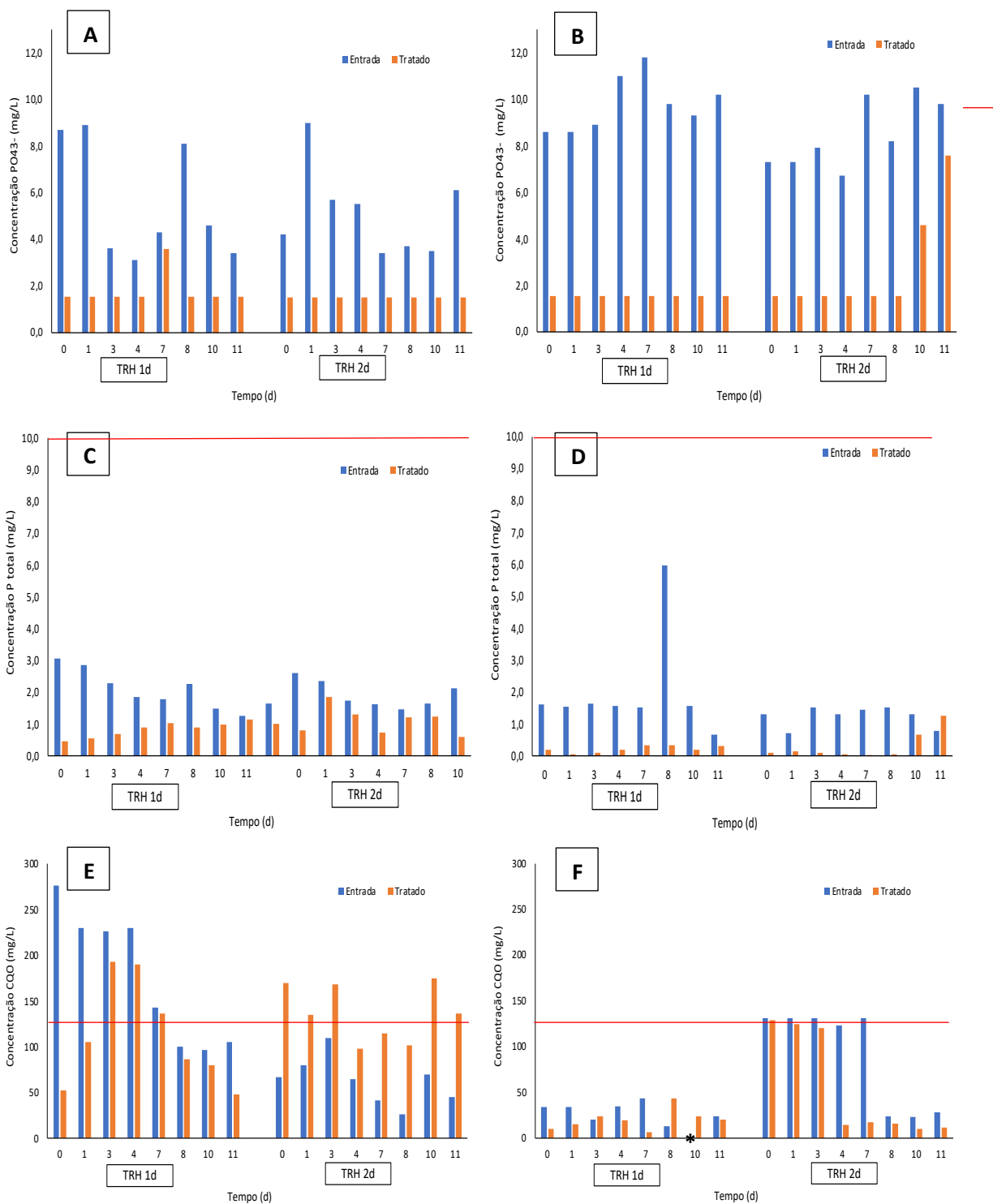


Figura 16 - Concentrações de PO_4^{3-} ; P total e CQO, no efluente de Entrada e no Tratado para (A; C; E) campanha de verão e (B; D; F) campanha de outono, para ambos os TRH (1 e 2d). A vermelho encontram-se os VLE para cada nutriente imposto pela licença de descarga da ETAR. (*) Valor de concentração de 1060 mg L^{-1} de CQO, devido a falha no sedimentador secundário da ETAR, ao 8º dia do TRH 1d, da campanha de outono.

Através das taxas de remoção, espelhadas na figura 17, é possível verificar que, em ambas as campanhas, existiram remoções de nutrientes, entre os 30 – 91 %, segundo as medianas observadas (Figura 17). Perante a distribuição dos dados, consideraram-se as medianas, sendo estes os valores mais representativos da amostra.

Quanto à remoção de N_T no verão, foi de 64,2 %, para TRH 1, e de 38 %, para TRH 2, sendo esta diferença significativa ($p < 0,05$). Comparativamente, com outros estudos já realizados em culturas monoalgais, estas taxas são bastantes promissoras, uma vez que os TRH testados nestes trabalhos (10d a 28d) são muito superiores às do nosso estudo, para taxas de remoção próximas (52 %) para TRH 20, pela espécie *C. vulgaris* (Abou-Shanab *et al.*, 2013). No outono, as taxas de remoção de N_T não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), sendo de 27,4 %, para TRH 1, e 44,2 %, para TRH 2. Em comparação com o estudo de Wang *et al.* (2014), onde apresenta taxas de remoção entre 46 – 93 % para TRH entre 12 a 28 dias, o nosso sistema é eficaz pois é possível com um TRH de 2d remover perto deste valor mínimo. Ainda, em relação à taxa de remoção de N_T , esta teve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre campanhas, para o TRH 1d, onde foi superior no verão (64,2 %) em relação ao outono (27,4 %).

Para o P total as taxas de remoção, no verão, não foram significativamente diferentes entre TRH ($p > 0,05$). No outono, estas apresentam valores de mediana mais elevados, 87,8 % para TRH 1 e 91,6 % para TRH 2, não existindo, também, diferenças significativas entre TRH ($p > 0,05$). Contrariamente, existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre estações, sendo as taxas de remoção mais elevadas no outono, em ambos os TRH. Comparativamente, com os estudos referidos anteriormente em TRH 20, com a espécie *C. vulgaris*, onde a taxa média é de 57 %, a remoção de P total é bastante favorável, pois apresenta num só dia uma taxa média aproximada da referida por Abou-Shanab *et al.* (2013).

A NH_4^+ , no outono para o TRH 1d, foi o nutriente com maior taxa de remoção (89,5 %) não acontecendo o mesmo no TRH 2d da mesma campanha, que foi a menor taxa de remoção comparativamente ao verão. Esta diferença pode ser explicada pela diferença de pH, sendo no verão mais baixo. Para valores mais baixos, a amónia encontra-se mais biodisponível para as microalgas, uma vez que não se dá a reação ácido-base que poderia levar à volatilização da amónia na forma de NH_3 (Morales-Amaral *et al.*, 2015).

O NO_3^- apresenta taxas de remoção para o verão de 33,7 %, TRH 1, e 51,3 %, para TRH 2; 30,6 %, TRH 1, e 33,7 %, TRH 2, no outono, existindo apenas diferenças significativas entre estações, sendo superior no verão em ambos os TRH ($p < 0,05$). Estes

valores explicam-se pela preferência das microalgas pela amónia em vez de nitratos (Maestrini *et al.*, 1986; Abdelaziz *et al.*, 2013).

Quanto aos PO_4^{3-} , as taxas de remoção são de: 81 %, para TRH 1, e 64,3 %, para TRH 2, de verão; 83,5%, para TRH1 e 33,7 %, para TRH 2 de outono. Estas apresentam diferenças significativas entre TRH para a campanha de outono e entre estações para o TRH 1, onde são superiores no TRH 1, para ambas as campanhas. Apesar de não existir valor mínimo para descarga, estas remoções são benéficas para a valorização da biomassa, uma vez que as microalgas usam o P dos fosfatos para produzir ATP, para produção de lípidos e constituição celular (Miyachi *et al.*, 1964).

Desta forma, verifica-se que o sistema, tanto em condições de verão ($T_{\text{min.}}$ 20,0 °C – $T_{\text{máx.}}$ 29,6 °C; 0,0 mm de precipitação média mensal) como de outono ($T_{\text{min.}}$ 13,7 °C – $T_{\text{máx.}}$ 20,0 °C; 10,09 mm de precipitação média mensal) (IPMA, 2021), para ambos os TRH testados, é capaz de remover os nutrientes presentes nas ARU.

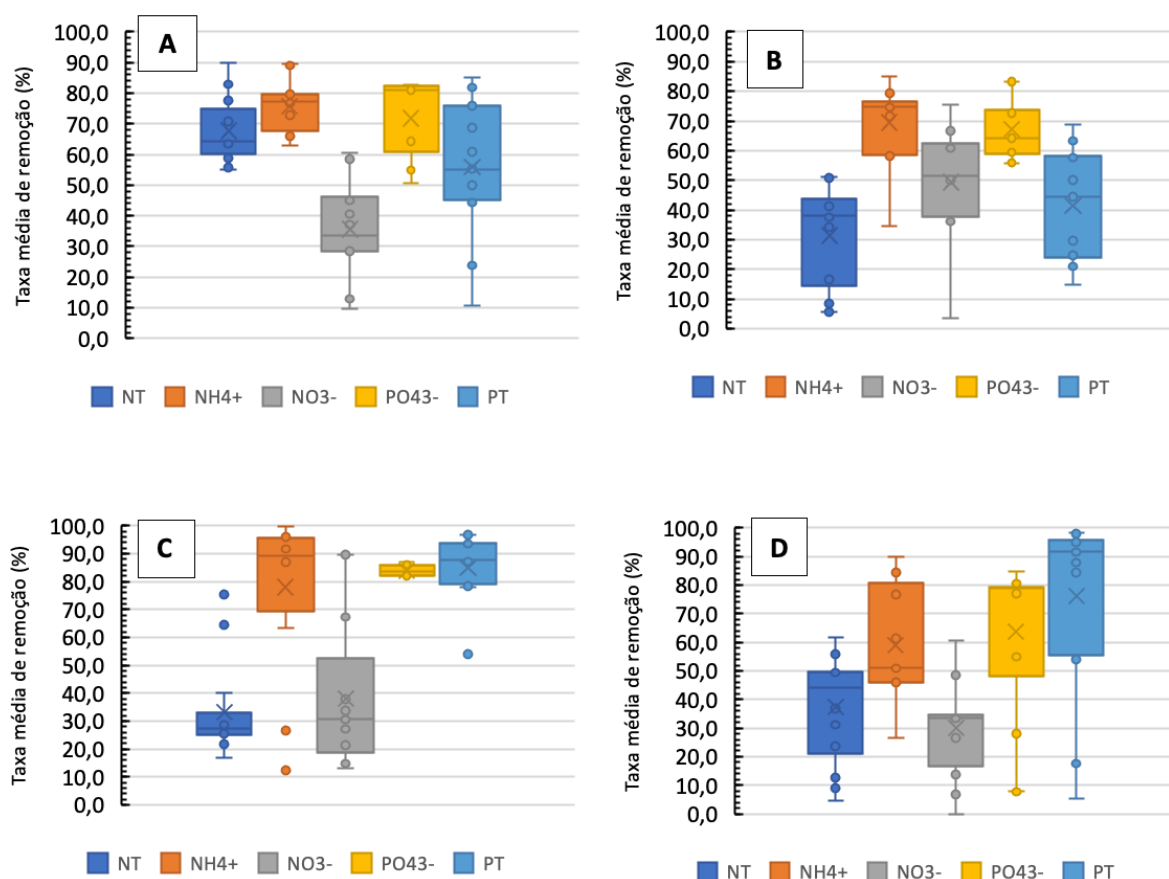


Figura 17 - Taxas de remoção (%) obtidas nas campanhas de (A-B) verão e (C-D) outono, nos (A; C) TRH 1d; (B; D) TRH 2d.

Através dos dados de SST (mg L^{-1}) medidos para o efluente, à entrada e tratado, em ambas as campanhas e TRH, verifica-se, através dos gráficos da figura 18, que para a campanha de verão, devido à maior concentração de biomassa no sistema, a presença de SST à saída é superior à de entrada do sistema. Este facto mostra uma ineficiência do sistema de sedimentação acoplado ao sistema de reatores GreenDune[®]. Contudo, no outono, esta diferença, entre a concentração de SST, de entrada e de saída, torna-se inferior, devido à mais baixa concentração de biomassa no interior dos reatores, associada, em parte, à diluição do efluente pelos eventos pluviais feitos sentir durante a campanha (Figura 18).

A diferença da concentração de SST no efluente tratado entre campanhas poderá, também, estar relacionada com a formação de biofilmes, nas diferentes estações, que promovem a fixação da biomassa. Estes ocorrem devido à variação das condições de temperatura, intensidade luminosa, pH, concentração de nutrientes e de matéria orgânica, que pode provocar alterações no consórcio entre as espécies de microalgas e bactérias (Rolim, 2014). Por conseguinte, a variação da composição do consórcio pode ser mais ou menos propícia à formação de biofilmes, dependendo do tipo de espécies predominantes (Bower *et al.*, 1996; Chmielewski e Franl, 2003; Rolim, 2014). A partir dos gráficos A e B da figura 18, verifica-se uma menor retenção de SST para o TRH 2d, em comparação com o TRH 1, na estação de verão, podendo ser justificada pelo menor aporte de matéria orgânica para esta experiência/TRH, verificada a partir do gráfico E da figura 16. Neste gráfico é notória a menor concentração de CQO no efluente a tratar. Deste modo, uma menor concentração de matéria orgânica, aliada às condições abióticas, leva a uma menor concentração de espécies bacterianas, o que pode influenciar a composição do consórcio existente e a formação de biofilmes e, conseqüentemente, a retenção da biomassa (Rolim, 2014). Assim, a concentração de SST no efluente tratado desta experiência é inferior. Pelo mesmo motivo, verifica-se uma menor concentração de SST no efluente tratado para o TRH 1, em comparação com o TRH 2, de outono.

A ineficiência do sistema de sedimentação, para além de diminuir a quantidade de biomassa recolhida, excede, nas condições de verão, o VLE imposto por lei de SST para a descarga das ARU tratadas, que é fixado em 35 mg L^{-1} (Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de junho) sendo este um ponto fulcral de melhoramento do sistema em causa. Para melhorar o processo de recuperação da biomassa existem vários estudos onde são utilizados métodos de autofloculação, onde é favorecida a aglutinação e a formação de biofilmes por parte das células e, por conseguinte, a sedimentação ou arrastamento mecânico à superfície dos tanques (Rashid *et al.*, 2013; Banerjee *et al.*, 2013).

Na referida ETAR (QL) ao serem tratados em média 3 588 000 L d⁻¹ de ARU, através dos dados de concentração de biomassa (produção máxima de 50 mg L⁻¹) seria possível esta ETAR produzir através deste sistema piloto 179,4 Kg d⁻¹ de biomassa, caso o sistema de sedimentação apresentasse uma boa capacidade de separação da biomassa produzida, ou seja, 65 481 Kg ano⁻¹ de biomassa. Este sub-produto poderia ser uma mais valia, pela sua valorização, consoante a sua composição.

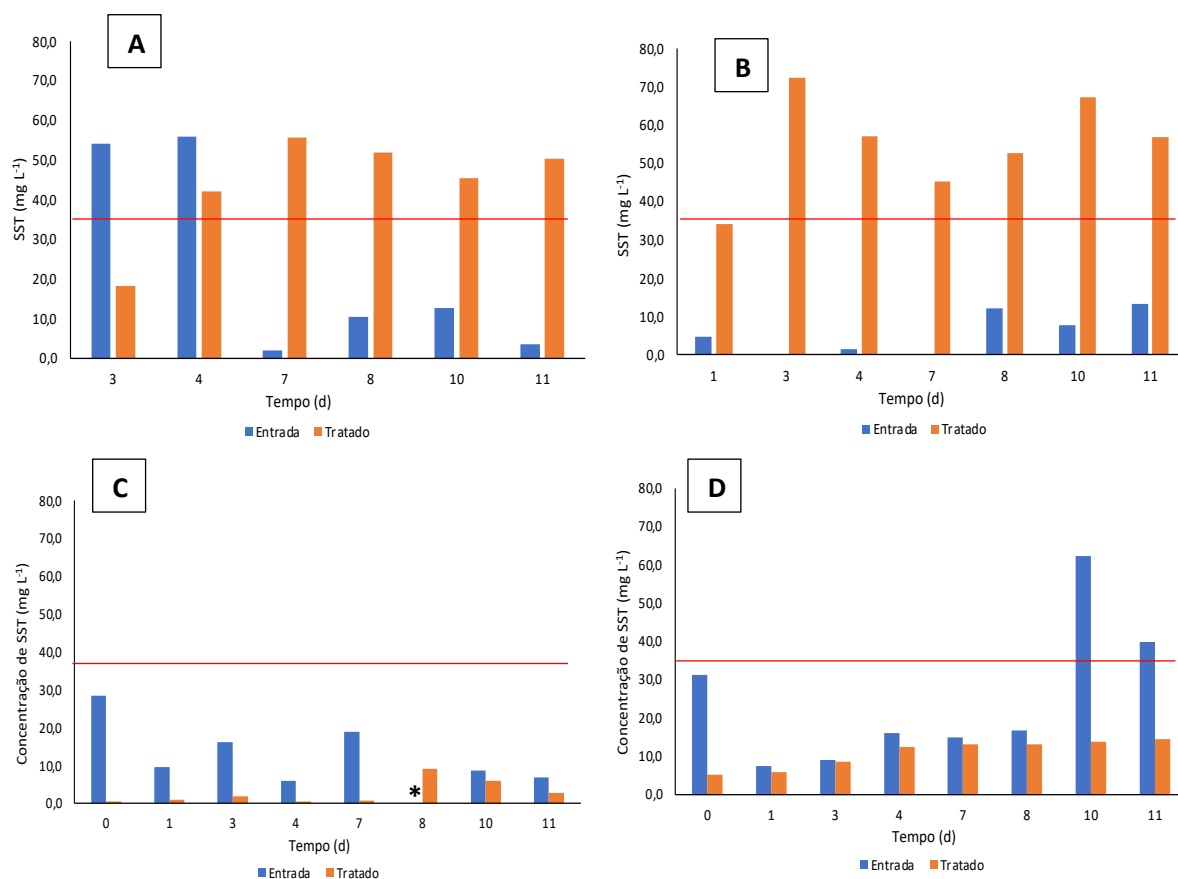


Figura 18 - SST (mg L⁻¹) no efluente de entrada e no efluente tratado, nas campanhas de (A-B) verão e (C-D) outono, para os TRH (A; C) 1d e (B; D) 2d, respetivamente. Linha a vermelho indica o VLE definido para a referida ETAR (35 mg L⁻¹). (*) concentração de SST no efluente de entrada, no 8º dia, do TRH1d da campanha de outono (C), de 968 mg L⁻¹, devido a falha no sedimentador secundário da ETAR.

4.1.2. Composição da biomassa obtida

Quanto à composição da biomassa obtida na campanha de verão verifica-se que a percentagem de lípidos, para ambos os TRH, se encontra próxima dos valores apresentados em vários estudos, que indicam uma percentagem de lípidos entre 13-30 % para biomassa de microalgas cultivadas em águas residuais (Arbib *et al.*, 2014; He *et al.*, 2013). No entanto, na campanha de outono a percentagem de lípidos é significativamente inferior, em cerca de 50 % (Figura 19). A maior percentagem de lípidos foi observada no verão, em ambos os TRH,

possivelmente devido às condições de cultivo, onde a temperatura foi mais elevada, existiu maior fotoperíodo e maior intensidade luminosa, fazendo com que a fotossíntese tenha sido maior e, por conseguinte, a síntese lípica também. (Figura 19A) (Radman e Costa, 2008; Gouveia e Oliveira, 2009).

No que diz respeito à percentagem de cinzas, a partir dos dados obtidos observa-se uma diferença entre as duas estações do ano testadas, tendo o outono maior quantidade. Entre TRH não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Este facto pode ser explicado por um possível aumento do número de saís associados é entrada no sistema na campanha de outono pela ocorrência pluvial que intercetou o sistema. Desta forma, ao digerir a matéria orgânica a percentagem de cinzas é superior à campanha de verão, podendo mostrar uma dificuldade na valorização para a produção de biocombustíveis.

Relativamente à percentagem de proteínas, na campanha de verão, a percentagem obtida foi de 34,7 %, em TRH 1d. Valor superior aos estudados por Arbib *et al.* (2014) em cultivo de *bloom* natural de ARU, de 22 %, e aproximados de Batista *et al.* (2013) onde estudaram várias espécies com potencial para produção de compostos para alimentação (38 %). No estudo de Martinez *et al.* (2000), em meios controlados com a espécie *Scenedesmus obliquus*, obtiveram uma percentagem inferior às obtidas (12 %), denotando-se assim uma vantagem na produção de *bloom* natural em águas residuais (Martinez *et al.*, 2000). Para o TRH 2d, da campanha de verão, obteve-se a menor percentagem de proteínas (29,2 %) devido à menor remoção de N_T nesta experiência (Figura 17B), sendo este um nutriente essencial à síntese proteica (Martinez *et al.*, 2000).

Quanto aos hidratos de carbono, obtiveram-se valores mais elevados para a campanha de verão (36,8 %), para TRH 2d. O pH, nesta experiência, mantém-se constante ao longo da mesma. Esta regularidade poderá indicar que os níveis de CO_2 no meio e as restantes condições de cultivo foram capazes de levar a um aumento da fixação de C na fotossíntese e, por conseguinte, um aumento da produção de hidratos de carbono. Contrariamente, nas restantes experiências os valores de pH apresentam oscilações, demonstrando uma possível variação da quantidade C no meio. No estudo de Batista *et al.* (2013), os mesmos obtiveram percentagens de 20 % de hidratos de carbono para cultura monoalgal de *C. vulgaris*, cultivada em reatores de 1 e 25 L à temperatura ótima de 34 °C. Conclui-se assim o benefício do cultivo em *bloom* natural de ARU para o equilíbrio de C no meio, devido à presença de bactérias aeróbias, produtoras de CO_2 , no seu metabolismo (Acién *et al.*, 2016).

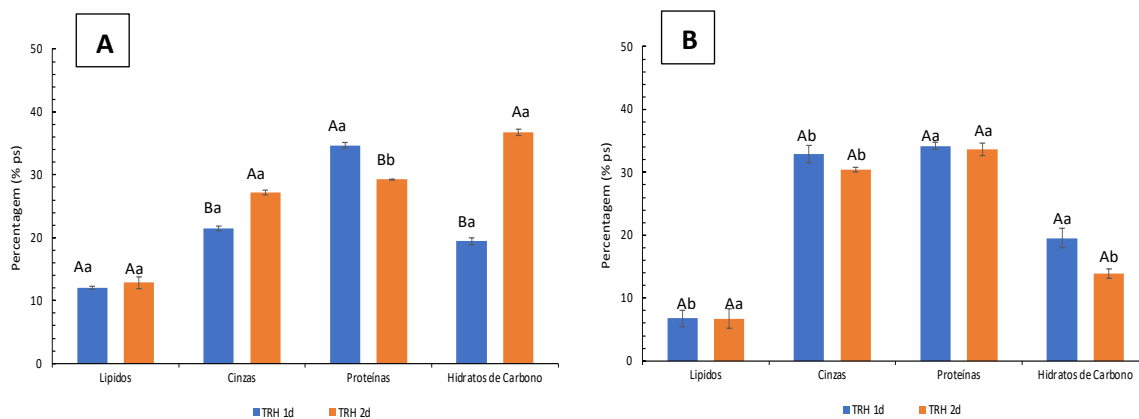


Figura 19 - Percentagens em peso seco (% ps) dos principais compostos presentes na biomassa (lípidos, cinzas, proteínas e hidratos de carbono), (A) campanha de verão e (B) campanha de outono. Em letras maiúsculas encontram-se as análises de significância ($P < 0,05$) entre TRH de cada estação e em minúsculas entre estações.

Perante os dados bioquímicos obtidos da biomassa produzida no sistema piloto em ambas as campanhas e TRH, é possível verificar o potencial aproveitamento da mesma para diversas aplicações, como produção de biocombustíveis e biofertilizantes. Existem quatro principais tipos de biocombustíveis comerciais (Jones e Mayfield, 2012, Dermibas, 2011): biodiesel, biotanol, biogás e biohidrogénio.

Para a produção de biodiesel é necessária a obtenção de ésteres metílicos de lípidos obtidos por via termoquímica. Estes podem ser extraídos com base na fração lipídica da biomassa obtida no tratamento de ARU. Para esta obtenção são utilizados processos que necessitam de temperaturas elevadas para um maior rendimento. Dados os valores de lípidos obtidos na biomassa da experiência piloto, espelhados na figura 19 (12 % e 7 %), para ambas as campanhas, verifica-se valores inferiores aos apresentados por Pereira *et al.* (2012), de 15 % - 55 %. Desta forma, conclui-se que a biomassa obtida não tem potencial para a produção de biodiesel. No entanto, dada a percentagem de hidratos de carbono apresentados na figura 19 (19,4 %; 36,8 %; 21,7 %; 23,0 %), para ambas as campanhas e respetivos TRH, é possível valorizar a biomassa na produção de bioetanol, principalmente na biomassa de TRH 2d de verão. A biomassa é fermentada utilizando leveduras que a convertem em etanol hidratado, sofrendo este depois uma desidratação para se obter bioetanol (Suali & Sarbatly, 2012).

Para a produção de biogás, fonte de biometano, é necessário submeter a biomassa obtida a uma fermentação anaeróbia por bactérias, leveduras ou fungos, necessitando de hidratos de carbono, proteínas, temperatura e pH adequados. Assim, dada a percentagem de proteínas demonstrada na figura 18 (34,7 %; 29,4 %; 34,2 %; 36,7 %) e hidratos de carbono, para ambas as campanhas e respetivos TRH, é possível aproveitar a biomassa obtida para a produção deste biocombustível. Pode ser utilizado diretamente como biocombustível gasoso

ou para gerar eletricidade, sendo ainda possível o aproveitamento da restante biomassa para a produção de outros produtos como biofertilizantes (Jones & Mayfield, 2012; Rawat *et al.*, 2011).

Outro biocombustível de possível produção, a partir da biomassa obtida, é o biohidrogénio, por fermentação, pirólise ou gasificação, através da composição em hidratos de carbono obtidas (Figura 19). Batista *et al.* (2014) obtiveram rendimentos superiores na produção de biohidrogénio através de biomassa húmida, dado que um dos pontos mais exigentes energeticamente é a sua secagem, torna-se bastante promissor (Batista *et al.*, 2014). Outra forma de produção de biohidrogénio, a partir de microalgas, é sujeitar a biomassa a uma pirólise ou gasificação. Em qualquer dos casos, o rendimento da produção aumenta com temperaturas mais elevadas (Dermibas, 2011).

Contudo, estes processos de obtenção de biocombustíveis necessitam, muitas vezes, de condições de obtenção dispendiosas e específicas na transformação associadas às biorefinarias. Contrariamente, a aplicação da biomassa como biofertilizante constitui um processo vantajoso pois a sua aplicação, devido ao conteúdo em hidratos de carbono e proteínas, é realizado de forma direta nos solos, sem custos associados. Desta forma, são uma alternativa aos fertilizantes sintéticos na rentabilidade económica e ambiental. São, ainda, fornecedores de nutrientes, para o crescimento das plantas, e de compostos, que atuam como bioestimulantes. O elevado conteúdo em microorganismos propicia o aumento de biodiversidade, contrariamente ao que acontece com os fertilizantes de síntese prejudiciais ao ambiente. Todavia, esta aplicação necessita de um estudo toxicológico prévio para caracterização da biomassa produzida, de forma a verificar o seu conteúdo em poluentes e contaminantes, que muitas vezes se encontram presentes nas ARU (Collahuazo *et al.*, 2019).

Assim, demonstra-se a capacidade de produção de um sub-produto a partir do tratamento de ARU por *blooms* naturais, capaz de ser utilizado e valorizado na produção de biofertilizantes, biohidrogénio, bioetanol ou biodiesel (Batista *et al.*, 2014; Miranda *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2012; Papazi *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2011).

4.2. Tratamento de efluentes em cultivos suplementados com CO₂

4.2.1. Tratamento de ARU

O cultivo em *batch* foi realizado com o objetivo de determinar qual a melhor condição de suplementação com CO₂ a utilizar no sistema em semi-contínuo. Através do modelo cinético de Verhulst e dos dados de crescimento obtidos, determinou-se a taxa mínima de renovação, ou seja, o menor TRH a utilizar para se evitar o colapso das culturas por wash-out da biomassa. Isto é, o TRH deve ser superior ao tempo de duplicação das células. Este modelo possibilita a determinação dos parâmetros cinéticos para a obtenção de um cultivo em semi-contínuo, como são caso a taxa mínima de renovação ou o fluxo necessário para a máxima produtividade, caso seja esse o objetivo. O cultivo em *batch* realizado demonstrou um crescimento: menor para a condição controlo (sem injeção de CO₂); idêntico para as injeções de 12 e 24 ml min⁻¹, durante 2 min, e um crescimento mais elevado para a condição de 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto, sendo a concentração máxima obtida de 2,5 g L⁻¹ (Figura 20). Estes dados parecem assim demonstrar que as microalgas necessitam apenas de uma pequena injeção durante menos tempo para que seja favorecido o seu crescimento, podendo a excessiva quantidade de CO₂, em relação aos restantes nutrientes, limitar o crescimento das microalgas. Assim, as concentrações de nutrientes C/N/P devem ser equilibradas de modo a obter-se um maior crescimento. Para além disto, a possível perda de CO₂ do reator dada a sua limitada solubilidade em água, é maior quanto maior for a quantidade injetada no mesmo intervalo de tempo (Cheng *et al.*, 2013; Acién *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019).

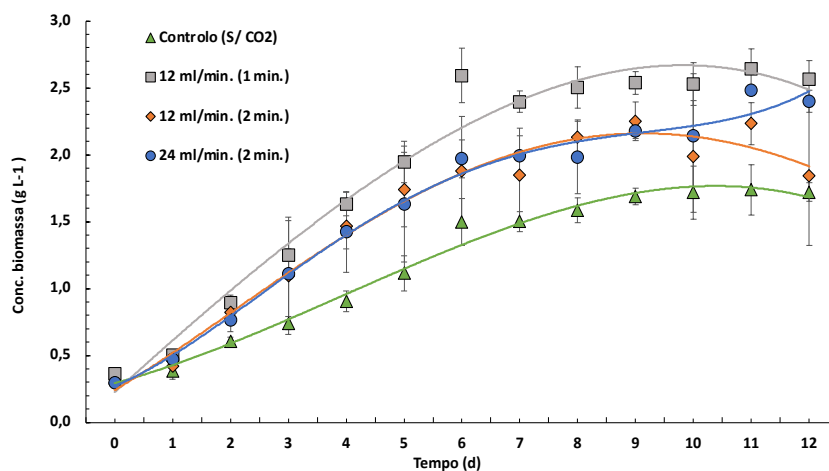


Figura 20 - Concentração de biomassa nas diferentes condições de injeção de CO₂ testadas em sistema *batch* na fase laboratorial. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores de OD realizadas em quadruplicados analíticos (4 leituras de absorvâncias) e duplicados biológicos (2 reatores por cada condição) ± Desvio padrão. As linhas no gráfico representam as linhas de tendência para cada crescimento.

Sendo o pH do meio influenciado pela presença de CO₂ e sucessivamente o crescimento e desenvolvimento das microalgas por este, é de alguma importância entender a relação entre estes nas diferentes condições de CO₂ testadas. Assim, ao medir diariamente o pH no interior dos reatores verificou-se pH mais elevado para o controlo e o menor para as condições de injeção durante 2 minutos (24 e 12 ml min⁻¹) (Figura 21). Este facto pode estar relacionado com a quantidade de CO₂ que fica dissolvido no meio, ficando disponível para assimilação pelas microalgas, assim como descrito por alguns autores, onde mostram as diferenças de crescimento para diferentes concentrações de CO₂ no meio (Morais e Costa, 2007; Chiu *et al.*, 2008; Chinnasamy *et al.* 2009). Para melhor entender este facto, foram medidos os pH, antes e após injeção, para verificar os perfis de alteração de pH ao longo do tempo nas diversas condições. Através destes, representados no gráfico B da figura 21, é possível verificar a diferença que existe, entre condições, na diminuição de pH, influenciada pela injeção de CO₂. Para 24 e 12 ml min⁻¹, durante 2 minutos de injeção, verifica-se uma redução exponencial nos primeiros 5 minutos, mas um retorno a valores aproximados de pH, anteriores à injeção, após 30 minutos. Contrariamente, a injeção durante 1 minuto de 12 ml min⁻¹ demonstrou uma diminuição menos acentuada após injeção, mas mais prolongada ao longo do tempo (Figura 19). Desta forma, demonstra-se, nos gráficos da figura 21, a ineficácia de alteração de pH e, conseqüentemente, de crescimento na injeção de CO₂ durante 2 minutos, para ambas as concentrações, e a eficácia da concentração 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto.

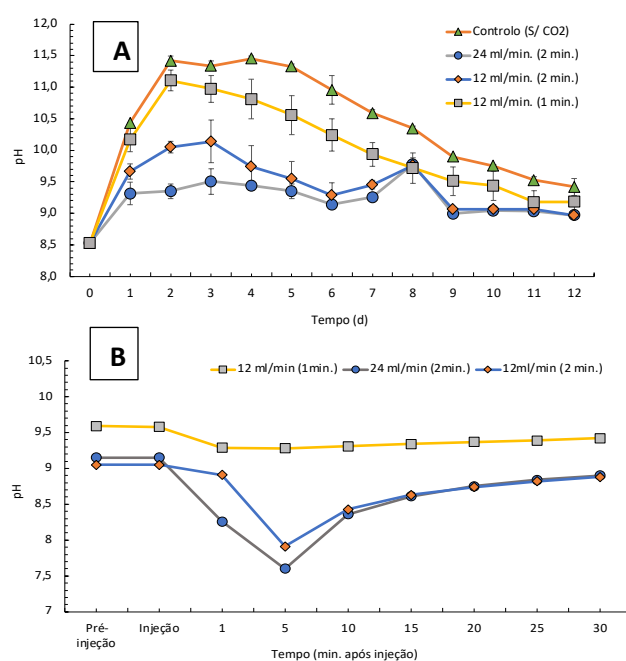


Figura 21 - (A) Valores de pH nos cultivos, nas diferentes condições de injeção de CO₂ testadas em sistema batch na fase laboratorial. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores medidos nos reatores, em duplicados biológicos \pm Desvio padrão; (B) Perfis de pH antes e após as injeções de CO₂ nas culturas.

Após a realização dos cultivos em *batch*, foi possível determinar, a partir da modelação de Verhulst, qual a condição que obteria menor taxa mínima de renovação ($\theta_{min.}$) sem que ocorra *washout* da cultura, ou seja, a que realizaria tratamento com o menor TRH. Na tabela 4, apresentam-se os resultados, obtidos pela modelo de Verhulst ao serem introduzidos os dados de crescimento celular (concentração de biomassa) dos cultivos, nas diferentes condições de injeção de CO₂ testadas. Através destes dados, é possível verificar que a condição de 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto, foi a que apresentou a menor taxa mínima de renovação ($\theta_{min.} = 1,6$ d), aproximadamente 2 d, mostrando ser esta a condição que ocorreria com menor TRH, sem que se dê *washout* da cultura, em sistema semi-contínuo. Além disso, os valores dos restantes parâmetros, obtidos através da modelação referentes à obtenção de cultivo com máxima produção de biomassa, foram superiores para a condição de 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto (Tabela 4). Desta forma, dada esta condição ter sido a que obteve maior concentração celular no cultivo em *batch* e a menor taxa mínima de renovação ($\theta_{min.}$), verificou-se que a condição que melhor se adequaria ao estudo de melhoramento com suplementação de CO₂ seria a de 12 ml min.⁻¹, durante 1 minuto. Assim, de acordo com os resultados da modelação, foi feita uma renovação diária do efluente, a uma taxa de $1/\theta_{min.}$ L d⁻¹, ou seja, 0,5 L d⁻¹ do efluente nos reatores, de modo a cumprir o TRH definido pelo modelo.

Tabela 4 - Parâmetros operacionais obtidos a partir do modelo cinético de Verhulst, para as condições de CO₂ testadas, em reatores bubble column de 1L de volume útil. ($\theta_{min.}$) Taxa mínima de renovação (L d⁻¹); (θ_p) Taxa de renovação para a máxima produção (L d⁻¹); (Q_p) Caudal para a máxima produtividade (L d⁻¹); (X_p) Concentração de biomassa em estado estacionário (mg L⁻¹); ($(Pv)_p$) Produtividade volumétrica (mg L⁻¹ d⁻¹).

Parâmetro operacional	Controlo	12 ml min ⁻¹ (1 min.)	12 ml min ⁻¹ (2 min.)	24 ml min ⁻¹ (2 min.)
$\theta_{min.}$	2,9	1,6	1,7	1,9
θ_p	5,8	3,3	3,5	3,7
Q_p	0,2	0,3	0,3	0,3
X_p	992,3	1301,2	1096,4	1119,1
$(Pv)_p$	169,9	397,3	315,0	299,9

$$\theta_{min.} = \frac{1}{TRH}; \theta_p = 2 \times \theta_{min.}; Q_p = \frac{V}{\theta_p}; X_p = \frac{X_m}{2}; (Pv)_p = \frac{X_p}{\theta_p}$$

Testou-se assim, em sistema semi-contínuo, o tratamento de ARU com as condições de 6, 12 e 24 ml min⁻¹, durante 1 minuto de injeção. Utilizando-se a taxa mínima de remoção de 2d, definida pelo modelo de Verhulst.

Perante os dados de concentração obtidos ao longo do tempo de experiência, espelhados na figura 21, é possível verificar uma proximidade de valores em todas as

condições. Embora, durante a fase de adaptação, ou seja, nos primeiros 5 dias, a condição de 6 ml min⁻¹ tenha sido a que apresentou menor concentração de biomassa (0,35 g L⁻¹) e a condição de 24 ml min⁻¹ a que atingiu maior concentração (2,12 g L⁻¹) (Figura 22). Após o 5º dia, efetuou-se a renovação diária de 50% do meio de cultura, o que fez com que a concentração de biomassa diminuísse até ao 10º dia após o qual se voltou a adaptar mostrando uma tendência de crescimento do 11º dia e após o 14º, com picos e regressões, tal como é normal em curvas de sistema semi-contínuo (Liu *et al.*, 2019). Desta forma, os dados de crescimento mostram uma homogeneidade para as condições testadas, de 6, 12 e 24 ml min⁻¹, durante 1 minuto de injeção de CO₂.

Quanto ao pH, a partir da figura 23, verificou-se que a condição de 24 ml min⁻¹ foi a que apresentou valores mais baixos, muito aproximados da condição de 12 ml min⁻¹. Sendo a condição de 6 ml min⁻¹ a que obteve maior pH, como esperado, devido à menor injeção de CO₂ (Figura 23).

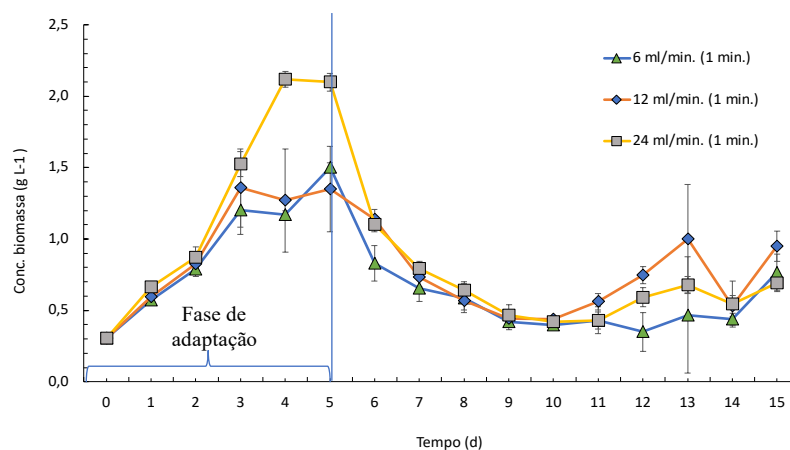


Figura 23 - Concentração de biomassa nas diferentes condições de injeção de CO₂ testadas em sistema semi-contínuo, na fase laboratorial, onde os primeiros 5 dias (até 5d) foram de adaptação em batch. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores de OD realizadas em quadruplicados analíticos (4 leituras de absorvâncias) e duplicados biológicos (2 reatores por condição) ± Desvio padrão.

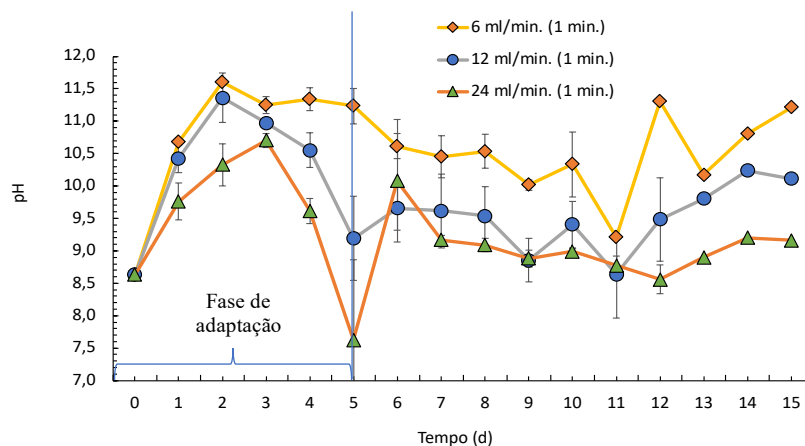


Figura 22 - Valores de pH, nas diferentes condições de injeção de CO₂, testadas em sistema semi-contínuo, na fase laboratorial, onde os primeiros 5 dias (até 5d) foram de adaptação em batch. Os dados foram obtidos a partir das médias dos valores medidos nos reatores em duplicados biológicos ± Desvio padrão.

Através das concentrações medidas no efluente a tratar e no efluente tratado, após cada renovação, foi possível obter os dados demonstrados na figura 24, para as concentrações de N total, P total e CQO (Figura 24). Foram também medidas as concentrações de PO_4^{3-} , NH_4^+ e NO_3^- , os quais obtiveram concentrações de 1,51, 32,5 e 6,75 mg L^{-1} no efluente a tratar, e concentrações abaixo dos valores de detecção dos kits utilizados: 0,05, 0,5 e 4 mg L^{-1} , para o efluente tratado, respetivamente. Verifica-se assim, a partir dos dados da figura 24, uma homogeneidade na remoção de N total, P total, PO_4^{3-} , NH_4^+ e NO_3^- , sendo estes removidos de igual forma a cada renovação, perante as concentrações apresentadas.

Verifica-se assim, a partir dos dados da figura 25, uma homogeneidade na remoção de N total, P total, PO_4^{3-} , NH_4^+ e NO_3^- , sendo estes removidos de igual forma a cada renovação, perante as concentrações apresentadas. Quanto ao CQO, este diminui a sua concentração consoante as condições do cultivo no interior dos reatores, podendo estar, como na experiência piloto, relacionado com as oscilações no consórcio presente a cada momento, existindo um aumento ou diminuição no consumo de matéria orgânica conforme a maior ou menor presença de bactérias. Todos as concentrações medidas no efluente tratado apresentaram valores abaixo dos VLE exigidos na licença de descarga da ETAR da Quinta do Lago.

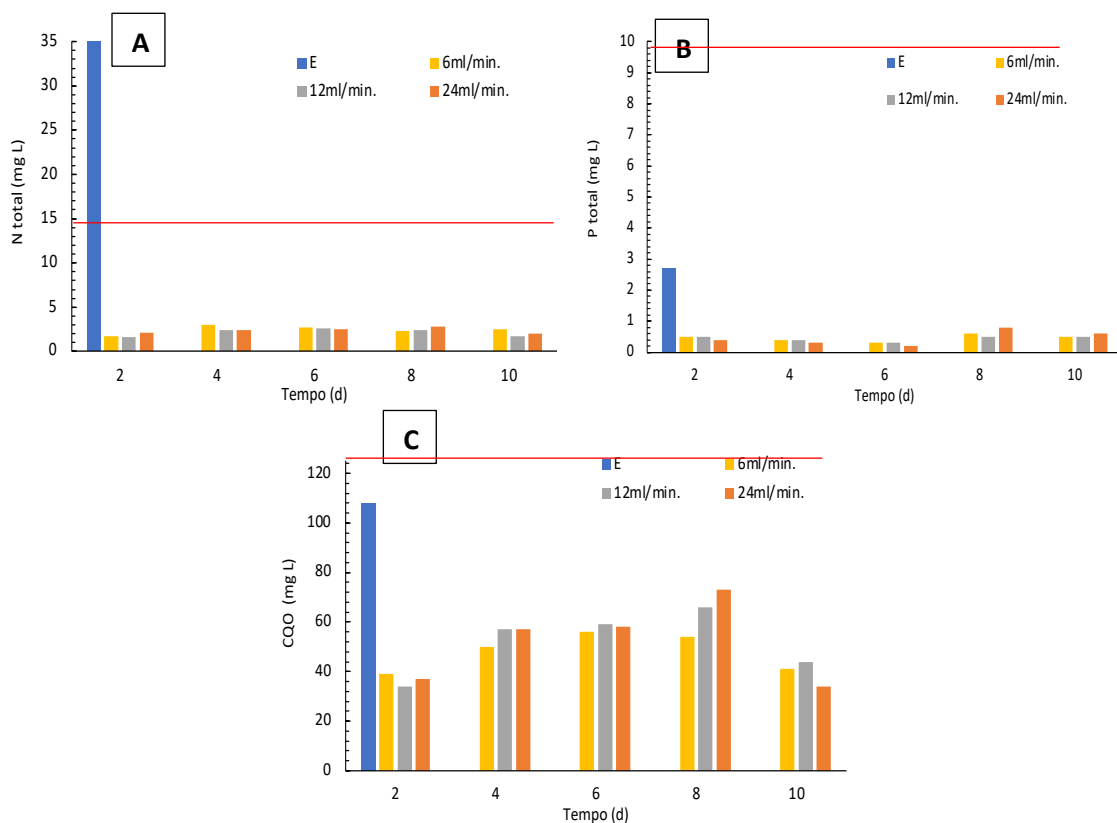


Figura 24 - Concentrações obtidas ao longo do tempo em sistema semi-contínuo, para (A) N total, (B) P total e (C) CQO. Sendo que para os restantes nutrientes as concentrações após tratamento foram na totalidade abaixo dos níveis de detecção dos kits utilizados. A vermelho estão delimitados os VLE impostos por lei, sendo (E) a concentração referente ao efluente a tratar.

Ao analisar-se as taxas de remoção, espelhadas na figura 25, verifica-se, quanto à remoção de N_T , que esta foi em média de 93 % em todas as condições testadas. Para o PT atingiu-se taxas de remoção em média de 83 %, demonstrando uma eficiência na remoção deste nutriente para todas as condições testadas. Os restantes nutrientes (NH_4^+ , NO_3^- e PO_4^+) apresentaram taxas superiores a 98,5; 40,7; 96,7 %, respetivamente. Desta forma, verifica-se a eficácia de todas as condições para a remoção de nutrientes, embora seja denotado a partir dos valores de N e P total uma maior eficácia para 12 e 24 $ml\ min^{-1}$ (Figura 25). Comparativamente às taxas de remoção apresentadas por Nayak *et al.* (2016) e por Razzal *et al.* (2013), onde testaram a biorremediação de ARU por diferentes espécies de microalgas em diferentes concentrações de CO_2 , verificam-se valores de remoção superiores para PO_4^+ (70 % - 82 %) e idênticos para NH_4^+ (90 % - 98 %) nas condições testadas. Verifica-se assim a eficácia do tratamento nas condições de CO_2 testadas.

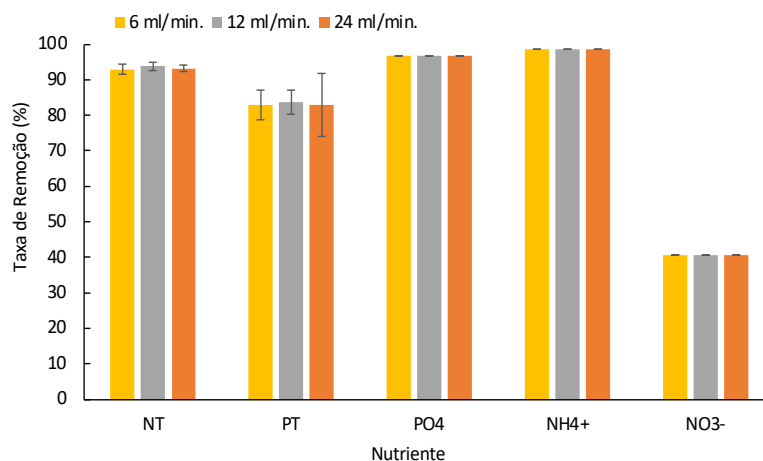


Figura 25 - Taxas médias de remoção do sistema em semi-contínuo.

Comparando as taxas de remoção obtidas na experiência piloto com a experiência laboratorial, verifica-se um aumento significativo ao utilizar qualquer uma das condições de suplementação de CO_2 impostas. Contudo, esta comparação merece alguma atenção relativamente à proporção de escala. Em escala laboratorial, o crescimento do consórcio e a remoção/biofixação de nutrientes é bastante mais eficaz pelo ambiente e pelas condições controladas existentes. Ainda assim, os dados parecem mostrar um aumento das taxas de crescimento e de remoção ao suplementar-se o sistema, mesmo com baixas quantidades de CO_2 . No entanto, a aplicação de um sistema de CO_2 puro, tal como instalado para a experiência em laboratório, não seria o mais eficaz e indicado, dado os GreenDune serem um sistema de reatores aberto, onde a dissolução do gás no meio seria difícil, deixando escapar

para a atmosfera grande parte do mesmo. Também a quantidade de gás a utilizar, para obter diferenças num sistema em escala piloto, seria um fator negativo nesta aplicação, sendo necessária bastante quantidade de gás por tempo. Acrescido a estes dois fatores operacionais, também, o custo bastante elevado e o impacto ambiental, associado à produção e transporte de CO₂ comprimido, necessário para as quantidades a injetar, seriam pontos negativos. Contudo, dada a existência excessiva de CO₂ atmosférico, enviado para o ambiente, principalmente pela indústria, como Gases com Efeito de Estufa (GEE), a mitigação destes poderia ser efetuada através da sua injeção, no sistema de tratamento. Nesse caso, as concentrações de CO₂ injetadas seriam variáveis, contudo, através desta experiência, verifica-se o benefício mesmo em baixas quantidades de gás, o que faria com que esta hipótese não se tornasse tão custosa, contrariamente, à utilização de CO₂ sintético. Existem, por isso, vários estudos onde são utilizados gases emanados pela indústria mostrando a possibilidade de suplementação de sistemas de tratamento com microalgas, tal como Razzak *et al.* (2013) indica. Esta hipótese, para aplicação no sistema de reatores em causa, necessitaria de ser comprovada por um possível estudo futuro, de forma a verificar que o custo é compensado pelo benefício ambiental e rendimento do sistema de tratamento.

4.2.2. Composição da biomassa obtida

De modo a poder comparar e entender se existe diferença entre os conteúdos bioquímicos presentes na biomassa resultante das diferentes condições de suplementação com CO₂ impostas, foram analisados os conteúdos em: lípidos, cinzas, hidratos de carbono e proteínas, tal como na experiência em escala piloto (Figura 26). Esta biomassa ao apresentar maior conteúdo bioquímico na sua composição poderá ser mais facilmente valorizável.

O conteúdo em lípidos, assim como nos restantes componentes produzidos no desenvolvimento das microalgas, está relacionado com o conteúdo nutritivo a que estas estão sujeitas. Os nutrientes, incluindo N, P e C, são essenciais à síntese de diversos compostos celulares, como aminoácidos, fosfolípidos e proteínas (Abdelaziz *et al.*, 2013). Contudo, no cultivo em *batch*, quanto à percentagem de lípidos na biomassa obtida pelas diferentes condições de suplementação testadas, não existiram diferenças significativas ($p > 0,05$). Este facto poderá dever-se à constante concentração de nutrientes, principalmente N, durante o cultivo. Vários estudos indicam que o stress nutritivo de N pode funcionar como um fator catalisador de uma maior quantidade de lípidos, por parte das microalgas (Lam e Lee, 2012; Abdelaziz *et al.*, 2013). O défice em N funciona como agente bloqueador da síntese de amido.

Direciona o carbono fixado pela fotossíntese para a produção de lípidos, como reserva, contrariamente, à produção de amido como fonte de carbono para a fotossíntese e incremento energético das células, reduzindo assim, a produção de biomassa (Lam e Lee, 2012).

Quanto ao teor em cinzas da biomassa obtida, em *batch*, a partir do gráfico A da figura 26, é possível verificar uma diferença significativa ($p < 0,05$) para o conteúdo da condição controlo, sendo superior à de 12 e 24 ml min⁻¹, durante 2 minutos e à de 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto, sendo esta última bastante inferior às restantes (4,9 %; 3,34 %; 2,87 %; 1,98 % ps, respetivamente). Estes dados demonstram assim a maior presença de matéria orgânica nos cultivos suplementados com CO₂. Este facto poderá dever-se ao possível domínio do consórcio por microalgas, consumindo o carbono disponibilizado.

Também quanto à composição de proteínas, em *batch*, esta foi superior no cultivo controlo (32,2 % ps), comparando com as restantes condições (29,3 % e 27,3 % para as condições durante 2 minutos e 28,2 % para a condição de 12 ml min⁻¹, durante 1 minuto). Quanto à percentagem de hidratos de carbono, não existiu qualquer diferença significativa ($p > 0,05$), mostrando igualdade entre as condições e o controlo.

Desta forma, quanto ao cultivo em *batch*, os dados de composição da biomassa parecem mostrar um benefício na suplementação com CO₂ de forma a aumentar a concentração de biomassa microalgal, uma diminuição do conteúdo de cinzas, mas uma igualdade em relação aos restantes compostos da biomassa. Este facto dever-se-á provavelmente ao tipo de cultivo, em *batch*, que leva a uma estabilização das concentrações de nutrientes disponíveis no meio, fazendo com que as células invistam o carbono na produção de energia em vez de conteúdos de reserva (Lam e Lee, 2012; Abdelaziz *et al.*, 2013).

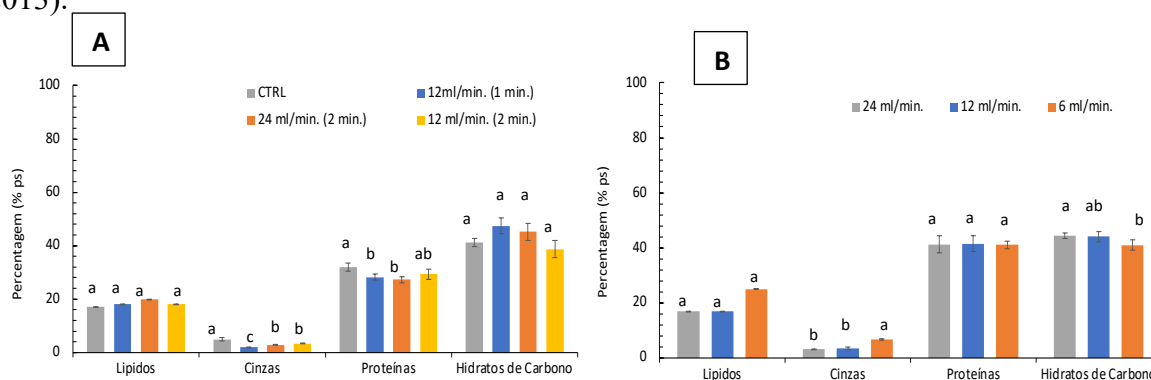


Figura 26 - Percentagens em peso seco (% ps) dos principais compostos presentes na biomassa (lípidos, cinzas, proteínas e hidratos de carbono), (A) *batch* e (B) *semi-continuo*. Em letras minúsculas foram testadas as significâncias ($P < 0,05$) entre condições em cada experiência, através de ANOVA. (CTRL) condição controlo, sem suplementação de CO₂.

Quanto ao cultivo em semi-contínuo (Figura 26B), os constituintes bioquímicos analisados na biomassa obtida para cada condição testada, apenas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre condições, para o conteúdo em cinzas e hidratos de carbono. Quanto ao conteúdo em lípidos e proteínas este não foi significativo ao comparar entre as três condições de CO₂ testadas ($p > 0,05$). O cultivo semi-contínuo, tal como no cultivo em *batch*, pode ter sido alvo da adaptação das células às concentrações de nutrientes disponíveis, fazendo com que a produção de compostos de reserva tenha sido menor. Parecendo assim demonstrar que a injeção de CO₂ não funciona como benefício para a produção de proteínas em *batch*.

A condição que apresentou maior percentagem de cinzas corresponde à condição de menor injeção de CO₂ (6 ml min⁻¹) e a menor, a condição de maior quantidade de CO₂ (24 ml min⁻¹), querendo isto mostrar que a presença de maior quantidade de CO₂ leva a uma diminuição do número de cinzas formadas, podendo estar relacionado com o aumento da quantidade de matéria orgânica formada (Figura 26B).

Quanto ao conteúdo em hidratos de carbono, em semi-contínuo, é possível verificar um aumento da percentagem para a condição de 24 ml min⁻¹ e mais baixa para a condição 6 ml min⁻¹. Mostrando, neste caso, diferença significativa, ao injetar mais quantidade de CO₂ por minuto. Este facto é justificado pela fixação de C pela fotossíntese, aumentando assim a produção de hidratos de carbono (Razzak *et al.*, 2013).

Comparativamente, com a experiência em escala piloto, verifica-se um aumento da percentagem de proteínas e hidratos de carbono devido, em parte, à suplementação com CO₂ e às condições de cultivo controladas. Desta forma, uma possível suplementação do sistema leva a um aumento da percentagem de compostos valorizáveis na biomassa obtida, podendo a partir da mesma obter maior rendimento para a produção de bioetanol, biogás ou biohidrogénio ou ainda para a aplicação direta como biofertilizante. Este facto é demonstrado pelos valores apresentados na tabela 5, onde são apresentadas as percentagens médias de N, C e H, obtidas a partir da análise elementar das biomassas recolhidas em cada experiência (piloto, para ambas as campanhas e TRH; laboratorial, para as condições de suplementação testadas em semi-contínuo).

Tabela 5 - Percentagens elementares de C, H e N da biomassa produzida na experiência piloto e laboratorial (média \pm desvio padrão)

	N (%)	C (%)	H (%)
Experiência Piloto	5,06 \pm 1,17	28,99 \pm 5,01	4,97 \pm 0,49
Experiência Laboratorial	5,00 \pm 0,42	50,51 \pm 1,45	7,82 \pm 0,27

Verifica-se, a partir destes dados, uma igualdade nas percentagens de N, contrariamente às de C e H, onde se verifica um aumento considerável para a experiência laboratorial (Tabela 5). Este facto demonstra o aumento da fixação de carbono e hidrogénio, através da suplementação com CO₂, levando, conseqüentemente, ao aumento da composição de hidratos de carbono e proteínas. Assim, a presença de maiores concentrações destes compostos potencia energeticamente a biomassa obtida para a aplicação na produção de biogás e na atividade dos biofertilizantes. Embora, a suplementação do sistema piloto com CO₂ puro não seja uma realidade viável, a sua suplementação com gases de combustão industriais parece ser uma alternativa (Jian *et al.*, 2011). A suplementação não apresenta vantagens de tratamento em relação à remoção de nutrientes, mas uma melhoria na qualidade final da biomassa obtida. Desta forma, através de uma biomassa melhorada nos seus compostos valorizáveis, a entidade gestora poderá beneficiar com a produção energética, a partir de biogás, para uso próprio das instalações e do sistema.

5. Conclusões

As ETAR são fundamentais na gestão e melhoramento do uso da água no ciclo urbano da água. A necessidade de evolução e melhoramento dos processos que constituem o tratamento de ARU nas ETAR é fulcral, de modo que estes sejam cada vez mais eco sustentáveis, dando contributos para a economia circular e para a diminuição da pegada humana no planeta.

Os processos de tratamento terciário nas ETAR têm como objetivo a remoção de nutrientes, principalmente de azoto, para que não provoquem eutrofização dos sistemas recetores mais sensíveis. Contudo, estes são um dos processos convencionais que mais custos e desvantagens ambientais têm no seu funcionamento. O gasto no arejamento para fornecimento de ar, a necessidade de adicionar uma fonte de C, a emissão de gases com efeito de estufa (e.g. N₂O) e a difícil gestão das lamas, produzidas como subproduto do sistema, são alguns exemplos.

A utilização das microalgas no processo de tratamento terciário de ARU pode constituir uma tecnologia eficiente, sustentável e mais económica. Para além do tratamento eficiente, as microalgas têm a vantagem de produzirem uma biomassa valorizável, da qual resultam compostos de elevado valor energético. A mesma poderá assim ser utilizada para a produção de biocombustíveis, como biogás e / ou bioetanol, que podem ser utilizados nas próprias ETAR ou noutras indústrias, e biofertilizantes. As microalgas, microrganismos fotossintéticos, são capazes de fixar os nutrientes presentes nas ARU, usando apenas luz solar e CO₂ atmosférico. Atualmente, existem vários estudos de sistemas de microalgas para tratamento de ARU, no entanto estes ainda necessitam de melhoramentos, principalmente na sua capacidade de tratamento e ao nível do design dos reatores, de modo a serem mais integrados na paisagem e ocupando a menor área possível.

Foram objetivos deste estudo testar a capacidade de tratamento do sistema de reatores piloto GreenDune[®], com a aplicação de dois TRH diferentes, e analisar a possibilidade de valorização da biomassa obtida; e, à escala laboratorial, avaliar os benefícios da suplementação com CO₂ na eficiência do tratamento e na composição da biomassa. Após o estudo dos dois TRH (1 e 2d) para duas estações do ano (verão e outono), no sistema piloto, é possível concluir que, tanto para o TRH 1d como para o TRH 2d para ambas as estações, o sistema conseguiu cumprir os requisitos impostos pela licença de descarga da respetiva ETAR, com remoção de nutrientes de azoto e fósforo (NH₄⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻) entre 48 – 85 %, produzindo maior quantidade de biomassa na campanha de verão. Este facto deveu-se,

provavelmente, à diferença de temperatura e condições meteorológicas. Devido à baixa concentração de matéria orgânica presente no efluente secundário, as microalgas dominaram o consórcio perante as bactérias. No que diz respeito à valorização da biomassa obtida, por apresentar maior quantidade de proteínas e hidratos de carbono, faz com que seja um produto com potencialização para a produção de biogás ou biofertilizantes (Lira *et al.*, 2012).

À escala laboratorial, ensaios de tratamento terciário de águas residuais reais com blooms de microalgas recolhidos na ETAR com suplementação de CO₂ mostraram que a suplementação com 12 ml min⁻¹, causou um aumento na produção de biomassa, de cerca de 50 %, em relação ao controlo. A biomassa produzida tinha maior quantidade de lípidos, proteínas e hidratos de carbono e menor proporção de cinzas, aumentando o potencial de valorização para produção de biocombustíveis. A injeção de CO₂ pode ser, assim, uma mais-valia. A suplementação com gases de combustão industriais poderá ser uma alternativa ao uso de CO₂ puro constituindo ainda uma forma de mitigação dos GEE libertados indústrias. Esta biomassa pode ter aplicação na produção de biogás, biohidrogénio, bioetanol ou biofertilizantes. Estes últimos tem, ainda, a vantagem do uso direto, sem necessidade de recorrer a processos industriais.

Concluindo, o trabalho realizado confirma o elevado potencial e eficácia da aplicação de *blooms* naturais de microalgas na remoção de nutrientes de azoto e fósforo durante o tratamento terciário de águas residuais com produção de biomassa, passível de ser rentabilizada através de várias aplicações.

6. Referências Bibliográficas

1. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, I., 2012, Microalgae and wastewater treatment, Saudi Journal of Biological Sciences, 19, 257-275;
2. Abdelaziz, A., Leite, G. e Hallenbeck, P., 2013, Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: II. Harvesting and conversion to biofuels, 34, 1807-1836;
3. Abou-Shanab, R., Ji, M., Kim, H., Paeng, K., Jeon, B., 2013, Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production, Journal of Environmental Management, 115, 257-264;
4. Acién, F., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M., Fernández-Sevilla, J., Molina-Grima, E., 2016, Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment, Appl Microbiol Biotechnol, 100, 9013-9022;
5. AOAC -Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists, ed.17, Virginia, 2000;
6. Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Perales, J., 2014, Capability of diferente microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater terciary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production, Water Research, 49, 465-474;
7. Banerjee, C., Ghosh, S., Sen, G., Mishra, S., Shukla, P., Bandopadhyay, R., 2013, Study of algal biomass harvesting using cationic guar gum from the natural plant source as flocculant, Carbohydrate Polymers, 92, 675-681;
8. Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014, Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, Second edition, Taylor & Francis;
9. Batista, A.P., Moura, P., Marques, P.S, Ortigueira, J., Alves, L. e Gouveia, L., 2014, Scenedesmus obliquus as feedstock for biohydrogen production by Enterobacter aerogenes and Clostridium butyricum, Fuel, 117, 537-543;
10. Behrens, P.W., 2005, Photobioreactors and Fermentors: The Light and Dark Sides of Growing Algae, in: Andersen, R.A., Algal Culturing Techniques, Elsevier/Academic Press; biomass for ethanol production, Bioresour, Technol., vol. 101, 14, 5330–5336;
11. Bligh, E., G., Dyer, W., J., 1959, A rapid method of total lipid extraction and purification, Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, Vol. 37, 8;
12. Bluemater, Ecoefficient solutions, <https://www.bluemater.com/pt-pt/equipment/fotobiorreactor-green-dune/>, consultado em 28/09/2021;
13. Cerqueira, P., 2020, Microalgae for the tertiary treatment of urban effluents in a pilot-scale system, Tese de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade do Algarve;
14. Cheng, J., Huang, Y., Feng, J., Sun, J., Zhou, J., Cen, K., 2013, Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing Chlorella PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors, Bioresource Technology, 144, 321-327;
15. Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., Das, K., 2009, Biomass Production Potencial of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature, International Journal of Molecular Sciences, 10, 518-532;
16. Christenson, L., Sims, R., 2011, production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts, Biotechnology Advances, 29, 686-702;
17. Clark, J., Luque, R., Matharu, A., 2012, Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 3, 183-207;
18. Collahuazo-Reinoso, Y., Araujo-Abad, S., 2019, Producción de biofertilizantes a partir de microalgas, CEDAMAZ, Revista del Centro de Estudio y Desarrollo de la Amazonia, 9 (2), 81-87;
19. De Farias Silva, C., Cerqueira, R., Neto, C., De Andrade, F., Carvalho, F., Tonholo, J., 2020, Developing a Kinetic model to describe wastewater treatment by microalgae based on simultaneous carbon, nitrogen and phosphorous removal, Journal of Environmental Chemical Engineering, 8, 103792;
20. Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de Junho de 1997, Diário da República, I Série – A, n.º 139. Disponível em: <http://dre.pt/pdf1sdip/1997/06/139A00/29592967.pdf> ;
21. Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto de 1998, Diário da República, I Série – A, n.º 176. Disponível em: <https://dre.pt/application/file/a/430505> ;
22. Decreto-Lei n.º 119/19, de 21 de agosto de 1998, Diário da República, I Série – A, n.º 176. Disponível em: <https://dre.pt/dre/detalhe/decreto-lei/119-2019-124097549> ;
23. Demirbas, A., 2010, Use of algae as biofuel sources, Energy Conversion and Management, 51, 2738-2749;
24. Demirbas, A., Demirbas, M., 2011, Importance of algae oil as a source of biodiesel, Energy

- determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28(3), 360-356;
25. Do Monte, H., Albuquerque, A., 2010, Reutilização de Águas Residuais, Série Guias Técnicos, ERSAR, ISEL;
 26. Duarte, A., 2007, Impacto das Alterações Climáticas na Gestão da Água, *Revista águas e resíduos*, série III:2,58-73;
 27. DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. e Smith, F., 1956, Colorimetric method for ed. 34, 13–14, 1783-1805;
 28. ERSAR, 2019, Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, Relatório Annual dos Serviços de Águas e Resíduos em Portugal, Vol. 1;
 29. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, AQUASTAT – FAO’s Global Information System on Water and Agriculture, http://www.fao.org/aquastat/en/overview/methodology/water-use_01/02/2021;
 30. Ferrell, J., Sarisky-Reed, V., United States, Department of Energy. Office of the Biomass, P., 2010, National algal biofuels technology roadmap a technology roadmap resulting from the National Algal Biofuels Workshop, December 9-10, 2008, University of Maryland. U.S. Dept. of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Office of the Biomass Program, Washington, DC;
 31. Gouveia, L. e Oliveira, A., 2009, Microalgae as a raw material for biofuels production; *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 269-274;
 32. Gouveia, L., 2011, Microalgae as a Feedstock for Biofuels, Springer Heidelberg, Berlin, Germany;
 33. Harun, R., Singh, M., Forde, G. M., & Danquah, M. K., 2010, Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1037–1047;
 34. He, P., Mao, B., Shen, C., Shao, L., Lee, D. e Chang, J., 2013, Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production, *Bioresource Technology*, 129, 177-181;
 35. Heredia-Arroyo, T., Wei, W., Ruan, R., Huc, B., 2011, Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials, *Biomass and Bioenergy*, 35, 2245-2253;
 36. Ho, S., Chen, C., Chang, J., 2012, Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and *Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36 (2), 269-274;
 37. Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R., 2011, Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂, *Applied Energy*, 88, 3336-3341;
 38. Kuo, C., Jian, J., Lin, T., Chang, Y., Wan, X., Lai, J., Chang, J., Lin, C., 2016, Simultaneous microalgal biomass production and CO₂ fixation by cultivating *Chlorella* sp. GD with aquaculture wastewater and boiler flue gas, *Bioresource Technology*, 221, 241-250;
 39. Lam, M., Lee, K., 2012, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, 30, 673-690;
 40. Lavoie, A., De La Noüe, 1985, Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquos*, *Water Research*, 19, 1437-1442;
 41. Lazarova, V., Bahri A., 2005, Water Reuse for irrigation: Agriculture, Landscapes and Turf Grass, CRC Press;
 42. Lira, R., Martins, M., Machado, M., Corrêdo, L., De Matos, A., 2012, As microalgas como alternativa à produção de biocombustíveis, *Reveng*, V 20, ed.5, 389-403;
 43. Liu, D., Lipták, B., 2000, WASTEWATERTREATMENT, Taylor & Francis Group, NW;
 44. Liu, S., Elvira, P., Wang, Y., Wang, W., 2019, Growth and nutrient utilization of green algae in batch and semicontinuous autotrophic cultivation under high CO₂ concentration, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188, 836-853;
 45. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol. Chem*, 193 (1), 265-75;
 46. Maestrini, S. Y., Robert, J.-M, Leftley, J. W., Collos, Y., 1986, Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, ed.102, 1, 75–98;
 47. Maier, R., Pepper, I., Gerba, C., 2009, Environmental microbiology, Cap. 24, ed. 2, 503-530;
 48. Marques, J., Sousa, J., 2007, Hidráulica urbana, Sistema de Abastecimento de Água e de Drenagem de Águas Residuais, Imprensa da Universidade de Coimbra, ed.4;
 49. Martinez, M., Sánchez, S., Jiménez, J., El Yousfi, F. e Muñoz, L., 2000, Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*, *Bioresource Technology*, 73 (3), 263-272;
 50. Mata, T., Martins, A., Caetano, N., 2010, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (1), 217–232;
 51. Metcalf & Eddy, Inc., 2003, Wastewater Engineering, Treatment and Reuse, Mc Graw Hill, ed. 4; microalga for bioethanol production; *Bioresource Technology*, 104, 342-348;

52. Miranda, J., Passarinho, P. e Gouveia, L., 2012, Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production, *Bioresource Technology*, 104, 342-348;
53. Mitra, D., van Leeuwen, J., Lamsal, B., 2012, Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products, *Algal Research*, 1, 40-48;
54. Miyachi, S., Kanai, R., Mihara, S., Miyachi, S., Aoki, S., 1964, Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 93(3), 625–634, Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90345-9](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(64)90345-9);
55. Morais, E., Moraes, L., Costa, J., Morais, M., 2016, Biodiesel and Bioethanol from microalgae, em: Carlos Ricardo Soccol, Ashok Pandey, Org., *Green Fuels Technology*, ed.1, EUA, Springer, 2016, 1, 1-31;
56. Morales-Amaral, M., Gómez-Serrano, C., Acien, F., Fernández-Sevilla, J., Molina-Grima, E., 2015, Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source, *Algal Research*, 12, 99–108;
57. Nayak, M., Karemore, A., Sen, R., 2016, Performance evaluation of microalgae for contaminant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application, *Algal Research*, 16, 216-223;
58. ONU, Nações Unidas, Centro regional de Informação para a Europa Ocidental, <https://unric.org/pt/agua/>, 01/02/2021;
59. Pandey, A., Lee, D., Chisti, Y., Soccol, C.R., 2013, *Biofuels from Algae*, Elsevier Science & Technology Books;
60. Papazi, A., Andronis, E., Ioannidis, N., Chaniotakis, N. e Kotzabasis, K., 2012, High Yields of Hydrogen Production Induced by Meta-Substituted Dichlorophenols Biodegradation from the Green Alga *Scenedesmus obliquus*, *PLOS One*, 7 (11), 1-16;
61. Pereira, C., Hobuss, C., Maciel, J., Ferreira, L., Del Pino, F., Mesko, M., 2012, Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas, *Quim. Nova*, Vol.35, 10, 2013-2018;
62. Pereira, H., Gangadhar, K., Schulze, P., Santos, T., de Sousa, C., Schueler, L., Custódio, L., Malcata, F., Gouveia, L., Varela, J., Barreira, L., 2016, Isolation of a euryhaline microalgal strain, *Tetraselmis* sp. CTP4, as a robust feedstock for biodiesel production, *Scientific Reports*, 6, 35663;
63. Pires, J.C., Alvim-Ferraz, M.C., Martins, F.G. e Simões, M., 2012, Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3043-3053;
64. Plöhn, M., Spain, O., Sirin, S., Silva, M., Escudero-oñate, C., Ferrando-Climent, L., Allahverdiyeva, Y., Funk, C., 2021, Wastewater treatment by microalgae, *Physiologia Plantarum*, 1-11;
65. Radman, E., Costa, J., 2008, Conteúdo Lipídico e Composição de Ácidos Graxos de Microalgas Expostas aos Gases CO₂, SO₂ e NO, *Quim Nova*, Vol. 31, 7, 1609-1612;
66. Rashid, N., Rehman, M., Han, J., 2013, Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*, *Chemical Engineering Journal*, 226, 238–242;
67. Rawat, I., Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011, Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production, *Applied Energy* 88, 3411-3424;
68. Razzak, S., Hossain, M., Lucky, R., Bassi, A., Lasa, H., 2013, Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing – A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622-653;
69. Razzak, S., Mohammad, H., Lucky, R., Bassi, A., De Lasa, H., 2013, Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing-A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 622-653;
70. Richmond, A., 2004, *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, Iowa, EUA;
71. Rosenberg, J., Oyler, G., Wilkinson, L., Betenbaugh, M., 2008, A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution, *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 430-436;
72. Ruiz, J., Arbib, Z., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Barragan, J., Perales, J., 2013, Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater, *Environmental Technology*, 34 (8), 979-991;
73. S. P. Choi, M. T. Nguyen, and S. J. Sim, 2010, Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii*
74. Schulze, P., Carvalho, C., Pereira, H., Gangadhar, K., Schüler, L., Santos, T., Varela, J., Barreira, L., 2017, Urban wastewater treatment by *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta), *Bioresource Technology*, 223, 175-183;

75. Sturm, B.S.M., Lamer, S.L., 2011, An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production, *Applied Energy*, 88, 3499-3506;
76. Suali, E., Sarbatly, R., 2012, Conversion of microalgae to biofuel, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 4316-4342;
77. Varfolomeev, S., Wasserman, L., 2011, Microalgae as Source of Biofuel, Food, Fodder, and Medicines, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 789-807;
78. Williams, P.J.I.B., Laurens, L.M.L., 2010, Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics, *Energy & Environmental Science*, 3, 554-590;