

**Tratamento biológico de um efluente da indústria  
cervejeira com simultânea produção de lípidos  
intracelulares, utilizando um sistema simbiótico de  
microalgas e leveduras**



**Inês Isabel Amaro Lopes Marques**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Biológica**

Orientador: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva

Coorientador: Professor Doutor José António Leandro dos Santos

**Júri:**

Presidente: Professora Doutora Maria Ângela Cabral Garcia Taipa Meneses de  
Oliveira

Orientador: Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva

Vogal: Professora Doutora Helena Maria Rodrigues Vasconcelos Pinheiro

**Novembro 2018**

## Agradecimentos

A elaboração desta tese não é fruto do trabalho apenas de um semestre, mas sim o reflexo de cinco anos de curso. Cinco anos de muitas aventuras e desafios, que me ajudaram a construir e a definir quem sou hoje; e de muita amizade e companheirismo, pois sozinha nunca teria chegado aqui. Agradeço a todos os que me acompanharam, pela diferença que fazem na minha vida.

À Doutora Teresa Lopes da Silva, obrigada pela oportunidade de realizar este estágio na Unidade de Bioenergia do LNEG, por toda a orientação, paciência, disponibilidade e simpatia, e pela ajuda incondicional na escrita da dissertação. Ao Dr. Alberto Reis e à Dra. Margarida Monteiro, pela simpatia, prestabilidade e ajuda ao longo de todo o trabalho. Ao Prof. José Santos por ter acreditado em mim desde o princípio e ter aceite ser meu orientador. E a todos os meus professores do técnico.

Um obrigada muito especial ao meu pai, pelo exemplo de coragem, de dedicação e de trabalho que é, mas sobretudo por ser um sonhador e me lembrar sempre de sonhar. Um obrigada igualmente especial à minha mãe, por todos os esforços que fez para que eu pudesse voar até aqui. Sem vocês nada disto teria sido possível, pelo menos não da forma boa que foi.

Um obrigada muito grande à minha maior companheira, a minha avó Gui, pelo porto de abrigo, pela presença e carinho incondicionais, e por nunca me deixar a caminhar sozinha. Aos meus avós Tanta e Zé, pela preocupação, pelo apoio e pelo sempre disponível abraço de força.

À caminheira, parceira e amiga que viaja comigo nesta aventura há vinte anos, a minha irmã Filipa, por tudo o que aprendemos e crescemos juntas a cada dia, pelo suporte que é e por caminharmos sempre lado a lado. Obrigada à princesa da minha vida, a minha irmã Malu, pela luz inspiradora que é para mim. Às minhas primas lindas, Margarida e Maria, pela infinita e desmedida presença; e aos meus padrinhos, Lhelha e Ângela, pela cumplicidade e suporte, obrigada! Também a ti Mia, pela amiga fiel e leal que és!

Ao meu amigão Gus, pela amizade incondicional, por nunca me deixar sozinha nem desamparada, por me ajudar a levantar quando mais preciso, pelos abraços, pelas infinitas aventuras e por tudo o resto que as palavras não dizem, mas o coração sente e mão deixa esquecer. Obrigada à minha mana do coração, a minha Larinha, que me acompanhou a cada dia destes últimos cinco anos e com quem travei cada luta, obrigada pela amizade verdadeira e pela equipa forte e imbatível que somos. E ao maninho do meu coração, Gonçalo, pelo testemunho de amor, alegria e entrega, pelo apoio e carinho incondicionais, e pelo lugar importante que ocupa na minha vida. Aos meus amigos muito especiais Luís e à Cátia, por me terem dado a mão há cinco anos e pela ajuda ímpar que desde aí me têm dado.

Agora uma das partes mais difíceis, agradecer às pessoas sem as quais este trabalho não teria sido possível. Hoje sei que sou uma pessoa mais rica, por tudo o que me ensinaram, mas sobretudo pelas amizades únicas que trago. Obrigada por terem tornado este trabalho possível e mais do que isso, por o terem tornado em boas memórias. Joana e Marta, mil obrigadas não chegam para agradecer tudo o que fizeram por mim, as conversas, os conselhos, as noitadas, a irmandade e dedicação. Carolina, a minha companheira de loucuras, obrigada pela prontidão e alegria com que me ajudaste sempre. Pedro, Alice e Marileide, obrigada pela presença, pelas gargalhadas e pela alegria; obrigada por tudo!

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto ERANet LAC (ELAC2014/BEE-0357) GREENBIOREFINERY: Processing of brewery wastes with microalgae for producing valuable Compounds.

Os efluentes tratados foram cedidos pela Sociedade Central de Cervejas e Bebidas S.A., de Vila Franca de Xira.

## Resumo

O objectivo desta dissertação consistiu no estudo do tratamento biológico de um efluente secundário da indústria cervejeira com simultânea produção de lípidos intracelulares, utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* e a levedura *Rhodospiridium toruloides*, aproveitando a complementaridade dos seus requisitos nutricionais para melhorar a eficiência do tratamento, bem como a produção lipídica.

De forma a promover o crescimento heterotrófico, o efluente foi suplementado com melaço de cana-de-açúcar, tendo sido previamente estudadas várias concentrações de açúcares totais, de forma a otimizar o processo para máxima eficiência do tratamento do efluente e máxima produção de lípidos intracelulares.

O tratamento biológico do efluente não foi eficaz em nenhuma das condições estudadas (diferentes concentrações de açúcares totais; culturas puras e cultura mista; condições de esterilidade/não esterilidade) uma vez que não se conseguiu obter, após o tratamento biológico, o efluente com os parâmetros estudados dentro dos valores legalmente exigidos para a sua descarga na natureza ou para a sua reutilização.

No entanto, cumpriu-se o objectivo do trabalho em termos de produção de lípidos intracelulares. Sendo que o teor máximo de lípidos intracelulares (19,6 % (p/p)) foi obtido após o tratamento do efluente com cultura mista desenvolvida no efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar, a uma concentração de 10 g/L de açúcares totais.

**Palavras-chave:** Tratamento biológico; Efluentes da indústria cervejeira; *Scenedesmus obliquus*; *Rhodospiridium toruloides*; culturas puras; culturas mistas

## Abstract

The objective of this dissertation was the study of the biological treatment of a secondary effluent from brewing industry with simultaneous production of intracellular lipids, using the microalga *Scenedesmus obliquus* and the yeast *Rhodospiridium toruloides*, in order to take advantage of their nutritional requirements complementarity, to improve the effluent treatment efficiency, as well as the intracellular lipids production from these microorganisms.

In order to promote the heterotrophic growth, the effluent was supplemented with sugarcane molasses, having previously been studied various total sugars concentrations, in order to select the best concentration that could result in the effluent treatment maximum efficiency, inducing the maximum lipid production.

The biological treatment of the effluent was not effective under any of the studied conditions (different total sugars concentrations; pure cultures and mixed culture; sterility/non-sterility conditions), since it was not possible to obtain, after the biological treatment, the effluent with the studied parameters within the values legally required for its discharge into nature or its reuse.

However, the objective of the work in terms of intracellular lipid production was fulfilled. Being that, the maximum lipid content (19,6% (w/w)) was obtained after the effluent treatment with the mixed culture developed in the effluent supplemented with sugarcane molasses, at a concentration of 10 g/L of total sugars.

**Keywords:** Biological treatment; brewing industry effluents; *Scenedesmus obliquus*; *Rhodospiridium toruloides*; pure cultures; mixed cultures

# Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Índice .....	vi
Lista de Figuras .....	ix
Lista de Tabelas .....	xii
Lista de Símbolos .....	xiii
1. Objectivos .....	1
2. Introdução.....	2
2.1. Ciclo Hidrológico Global e Distribuição da Água na Terra .....	2
2.2. Efluentes Industriais.....	2
2.3. Tratamento de Efluentes Industriais .....	2
2.3.1. Tratamento Convencional de Efluentes .....	4
2.4. Indústria Cervejeira .....	6
2.4.1. Efluentes da Indústria Cervejeira .....	7
2.4.2. Tratamento de Efluentes da Indústria Cervejeira .....	8
2.5. A razão de se apostar em tratamentos biológicos que envolvam microalgas .....	9
2.5.1. Relação Simbiótica entre Microalgas e Leveduras .....	11
2.5.2. Melaço de Cana-de-Açúcar como Fonte de Carbono .....	12
2.6. Produtos Intracelulares .....	12
2.6.1. Ácidos Gordos .....	12
2.7. Microrganismos utilizados neste trabalho.....	14
2.7.1. A microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> ACOI 204/07 .....	14
2.7.2. A levedura <i>Rhodospiridium toruloides</i> NCYC 921 .....	15
2.8. Modo de Operação de um Bioreactor.....	16
2.8.1. Curvas de Crescimento em Descontínuo .....	16
2.8.2. Transferência de Massa: Agitação e Arejamento .....	17
2.9. Citometria de Fluxo .....	18
2.9.1. Avaliação da Integridade da Membrana .....	20
2.9.2. Avaliação da Actividade Enzimática .....	21
3. Materiais e Métodos .....	22
3.1. Microrganismos e Pré-Inóculos .....	22
3.1.1. <i>Rhodospiridium toruloides</i> NCYC 921 .....	22

3.1.2. <i>Scenedesmus obliquus</i> (ACOI 204/07).....	23
3.2. Inóculos e Crescimentos.....	23
3.3. Monitorização dos Crescimentos.....	25
3.3.1. Observação Microscópica.....	25
3.3.2. Densidade Óptica e pH.....	25
3.4. Citometria de Fluxo.....	26
3.4.1. Integridade da Membrana.....	26
3.4.2. Actividade Enzimática.....	26
3.4.3. Clorofila.....	27
3.5. Contagem de Células.....	27
3.5.1. Câmara de Neubauer ou Hemocitómetro.....	27
3.5.2. Citometria de Fluxo.....	28
3.6. Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO).....	28
3.7. Determinação de Nitrogénio.....	30
3.7.1. Calibração do Eléctrodo Selectivo de Amónia.....	30
3.7.2. Determinação do Nitrogénio Total de Kjeldahl (NTK).....	31
3.7.3. Determinação do Nitrogénio Amoniacal ( $N - NH_3$ ).....	32
3.8. Determinação do Fósforo.....	33
3.9. Eficiências de Remoção de Nutrientes do Efluentes.....	33
3.10. Ácidos Gordos.....	33
3.11. Quantificação da Sacarose, Frutose e Glucose por HPLC.....	35
4. Resultados e Discussão.....	36
4.1. Caracterização do Efluente.....	36
4.2. Ensaio Preliminares de Citometria de Fluxo.....	37
4.2.1. Escolha dos corantes para a microalga <i>S. obliquus</i> .....	37
4.2.2. Optimização do Tempo de Incubação e do Volume de Corante para <i>S. obliquus</i> .....	41
4.2.3. Aplicação das Condições Seleccionadas para <i>S. obliquus</i> a <i>R. toruloides</i> .....	42
4.3. Crescimento de <i>S. obliquus</i> em Efluente e em Efluente Suplementado com Baixas Concentrações de Açúcares Totais.....	43
4.3.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento.....	43
4.3.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar.....	47

4.3.3. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento do Efluente.....	48
4.3.4. Resumindo .....	51
4.4. Crescimento de <i>S. obliquus</i> em Efluente Suplementado com Elevadas Concentrações de Açúcar.....	52
4.4.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento .....	52
4.4.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar .....	54
4.4.3. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento do Efluente.....	55
4.4.4. Resumindo .....	57
4.5. Crescimento de <i>R. toruloides</i> em Efluente e em Efluente Suplementado com Melaço de Cana-de-Açúcar.....	58
4.5.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento .....	58
4.5.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar .....	62
4.5.3. Efeito da Concentração dos Açúcares Totais no Tratamento .....	63
4.5.4. Resumindo .....	67
4.6. Crescimento da Cultura Mista de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> em Efluente Suplementado com Melaço de Cana-de-Açúcar .....	68
4.6.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento .....	68
4.6.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento .....	72
4.6.3. Resumindo .....	75
4.7. Crescimento da Cultura Mista de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> em Efluente Suplementado com Melaço de Cana-de-Açúcar: Esterilidade e Não Esterilidade.....	75
4.7.1. Efeito da Esterilidade no Crescimento.....	75
4.7.2. Efeito da Esterilidade no Tratamento do Efluente .....	78
4.7.3. Citometria de Fluxo .....	81
4.7.4. Resumindo .....	83
4.8. Tratamento Sequencial do Efluente .....	83
4.8.1. Resumindo .....	85
4.9. Comparação dos Resultados Obtidos Para Todos os Ensaios.....	86
5. Conclusões e Trabalho Futuro .....	90
Bibliografia .....	92
Anexos.....	97

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Layout de um tratamento convencional típico de efluentes.....	4
Figura 2.2: Corte transversal de um tanque de sedimentação circular. ....	4
Figura 2.3: Configuração de um rector biológico para remoção do nitrogénio.....	5
Figura 2.4: Esquema de um rector biológico para remoção do <i>N</i> e do <i>P</i> durante o processo de tratamento secundário de um efluente.....	6
Figura 2.5: Processo de produção de cerveja e dos principais resíduos. ....	6
Figura 2.6: Ciclo de Calvin .....	10
Figura 2.7: Relação entre células fotossintéticas e heterotróficas.....	11
Figura 2.8: Reacção de transesterificação de um triglicérido com uma molécula de metanol.....	13
Figura 2.9: Diferentes morfologias de <i>S. obliquus</i> : exemplo de plasticidade fenotípica.....	14
Figura 2.10: Curva de crescimento de uma cultura em descontínuo. ....	17
Figura 2.11: Configuração de um citómetro de fluxo e Representação esquemática de uma câmara de fluxo. ....	19
Figura 3.1: Placa de crescimento de <i>R. toruloides</i> em meio MEA.....	22
Figura 3.2: Rampa de crescimento de <i>R. toruloides</i> em meio MEA. ....	22
Figura 3.3: Pré-inóculo, em duplicado e em meio líquido, de <i>R. toruloides</i> .....	23
Figura 3.4: Incubadora com culturas de microalga; Pré-inóculo de <i>S. obliquus</i> .....	23
Figura 3.5: Câmara de Neubauer ou hemocítmetro; Representação da câmara de contagem.....	27
Figura 4.1: Avaliação da coloração das células de <i>S. obliquus</i> com a CFDA. ....	37
Figura 4.2: Avaliação da coloração simultânea das células de <i>S. obliquus</i> com CFDA e IP .....	38
Figura 4.3: Avaliação da coloração das células de <i>S. obliquus</i> com IP.....	39
Figura 4.4: Avaliação da coloração das células de <i>S. obliquus</i> com SytoxGreen .....	39
Figura 4.5: Integridade Membranar de <i>S. obliquus</i> : Coloração com IP ou SytoxGreen.....	40
Figura 4.6: Identificação em Citometria de Fluxo das populações de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> .....	41
Figura 4.7: Optimização do tempo de incubação e do volume de CFDA a usar com <i>S. obliquus</i> . ....	41
Figura 4.8: Optimização do tempo de incubação e do volume de SytoxGreen a usar com <i>S. obliquus</i> .....	42
Figura 4.9: CFDA: Aplicabilidade a <i>R. toruloides</i> das optimizações feitas com <i>S. obliquus</i> . ....	42
Figura 4.10: SytoxGreen: aplicabilidade a <i>R. toruloides</i> das optimizações feitas com <i>S. obliquus</i> .....	43
Figura 4.11: Curvas de crescimento de <i>S. obliquus</i> apenas em efluente em 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 20 g/L de açúcares totais por suplementação do efluente com melaço de cana-de-açúcar.....	44
Figura 4.12: Rectas de calibração de peso seco Vs DO(540 nm) para <i>S. obliquus</i> .....	44
Figura 4.13: Densidades celulares de <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais no meio .....	45
Figura 4.14: Sinais em FSC e SSC de <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares no meio. ....	45
Figura 4.15: Imagens Microscópicas do 7º d de ensaio de <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais.....	45
Figura 4.16: Análise aos ácidos gordos dos ensaios com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais. ....	46
Figura 4.17: Variações de pH dos crescimentos de <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais.....	46
Figura 4.18: Análise da actividade enzimática e da Integridade membranar de <i>S. obliquus</i> para os crescimentos até 20 g/L de açúcares totais.....	47

Figura 4.19: Análise de CQO para os ensaios com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais .....	48
Figura 4.20: Análise de N-NH <sub>3</sub> para os ensaios com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais.....	49
Figura 4.21: Análise ao P para os ensaios com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais. ....	50
Figura 4.22: Análise aos açúcares do ensaio com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais.....	51
Figura 4.23: Imagens microscópicas de contaminações obtidas nos ensaios com <i>S. obliquus</i> . ....	52
Figura 4.24: Curvas de crescimento de <i>S. obliquus</i> em 40 g/L, 60 g/L e 80 g/L de açúcares totais....	52
Figura 4.25: Imagens Microscopia dos crescimentos de <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais. .....	53
Figura 4.26: Variação de pH nas culturas de <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais. ....	53
Figura 4.27: Análise da Actividade Enzimática e Integridade Membranar de <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais .....	54
Figura 4.28: Análise de CQO do ensaio com <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais. ....	55
Figura 4.29: Análise de N-NH <sub>3</sub> do ensaio com <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais. ....	55
Figura 4.30: Análise de P do ensaio com <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais.....	56
Figura 4.31: Análise de açúcares do ensaio com <i>S. obliquus</i> de 40-80 g/L de açúcares totais.....	57
Figura 4.32: Curvas de crescimento de <i>R. toruloides</i> apenas em efluente e em 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais .....	58
Figura 4.33: Curvas de calibração de peso Vs DO (600 nm) para o ensaio de <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais .....	59
Figura 4.34: Imagens Microscopia do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais.....	60
Figura 4.35: Contagem de células do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais. ....	60
Figura 4.36: Sinais FSC e SSC do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais .....	61
Figura 4.37: Análise aos ácidos gordos do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais. 61	
Figura 4.38: Variações de pH do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais .....	62
Figura 4.39: Análise da Actividade Enzimática e Integridade Membranar de <i>R. toruloides</i> para o ensaio até 100 g/L de açúcares totais .....	63
Figura 4.40: Análise de CQO do ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais.....	64
Figura 4.41: Análise de N-NH <sub>3</sub> para o ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais.....	64
Figura 4.42: Análise de P para o ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais .....	65
Figura 4.43: Análise de açúcares para o ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais. ...	66
Figura 4.44: ER de açúcares para o ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais .....	67
Figura 4.45: Curvas de crescimento da população mista de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> para os ensaios apenas em efluente e em 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais .....	68
Figura 4.46: Imagens Microscopia para o ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais ....	69
Figura 4.47: Contagem de células para o ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais.....	70
Figura 4.48: Análise aos ácidos gordos do ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais... 71	
Figura 4.49: Variações de pH do ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais .....	71
Figura 4.50: Análise de CQO do ensaio com cultura mista até 60 g/L .....	72
Figura 4.51: Análise de N-NH <sub>3</sub> do ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais.....	73
Figura 4.52: Análise de P do ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais.....	73

Figura 4.53: Análise de açúcares do ensaio com cultura mista até 60 g/L de açúcares totais .....	74
Figura 4.54: Curvas de crescimento da cultura mista e de variação do pH, em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não Esterilidade .....	75
Figura 4.55: Imagens Microscopia da cultura mista em 10 g/L de açúcares totais em esterilidade.....	76
Figura 4.56: Imagens Microscopia da cultura mista em 10 g/L de açúcares totais em não esterilidade .....	77
Figura 4.57: Análise de ácidos gordos para o ensaio com cultura mista em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não Esterilidade. ....	77
Figura 4.58: Análise de CQO para o ensaio com cultura mista em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não esterilidade.....	78
Figura 4.59: Análise de N-NH <sub>3</sub> e NTK para o ensaio com cultura mista em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não Esterilidade .....	79
Figura 4.60: Análise de P para o ensaio com cultura mista em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não Esterilidade. ....	80
Figura 4.61: Análise aos açúcares para o ensaio com cultura mista em 10 g/L de açúcares totais: Esterilidade/Não Esterilidade .....	80
Figura 4.62: Análise por citometria de fluxo da cultura mista em condições de não esterilidade .....	81
Figura 4.63: Análise da Actividade Enzimática de <i>R. toruloides</i> na cultura mista em 10 g/L de açúcares totais, em condições de esterilidade. ....	81
Figura 4.64: Contagem do número de células de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> na cultura mista em 10 g/L de açúcares totais, em condições de esterilidade .....	82
Figura 4.65: Análise da integridade membranar de <i>S. obliquus</i> e de <i>R. toruloides</i> ; Análise da Actividade Enzimática de <i>S. obliquus</i> , na cultura mista em 10 g/L de açúcares totais, em esterilidade .....	82
Figura 4.66: Imagens Microscopia: Tratamento Sequencial.....	83
Figura 4.67: Análise citometria de fluxo: Tratamento Sequencial.....	84
Figura 4.68: Análise de CQO: Tratamento Sequencial.....	84
Figura 4.69: Análise de N-NH <sub>4</sub> e NTK: Tratamento Sequencial.....	85
Figura 4.70: Análise de P e de açúcares: Tratamento Sequencial.....	85

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Valores limite de emissão (VLE) na descarga de águas residuais.....	3
Tabela 2.2: Consumo de água pelos diferentes processos da indústria cervejeira.....	7
Tabela 2.3: Características físico-químicas de um efluente de indústria cervejeira na Índia .....	8
Tabela 2.4: Processos e operações unitárias de tratamento de efluentes .....	8
Tabela 3.1: Principais características da coluna Waters SugarPak 1 e condições operacionais.....	35
Tabela 4.1: Caracterização dos 3 efluentes usados ao longo deste trabalho .....	36
Tabela 4.2: Valores de concentração máxima de biomassa ( $X_{máx}$ ), produtividade volumétrica máxima ( $PX, máx$ ), tempo de duplicação ( $td$ ), e de taxa específica de crescimento máxima ( $\mu$ ), para o ensaio com <i>S. obliquus</i> até 20 g/L de açúcares totais.....	44
Tabela 4.3: Valores de taxa específica de crescimento máxima, $\mu$ , e de tempo de duplicação, $td$ , para o ensaio com <i>S. obliquus</i> a 40 g/L e a 60 g/L de açúcares totais.....	52
Tabela 4.4: Valores de produtividade volumétrica máxima, $PX, máx$ , de tempo de duplicação, $td$ , e de taxa específica de crescimento máxima, $\mu$ , para o ensaio com <i>R. toruloides</i> até 100 g/L de açúcares totais. ....	59
Tabela 4.5: Valores de tempo de duplicação, $td$ , e de taxa específica de crescimento máxima, $\mu$ , para o ensaio com cultura mista de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> até 60 g/L de açúcares totais .....	68
Tabela 4.6: Valores de $td$ e $\mu$ , para os crescimentos com cultura mista de <i>S. obliquus</i> e <i>R. toruloides</i> a 10 g/L de açúcares totais, em condições de esterilidade e de não esterilidade.....	76
Tabela 4.7: Resumo dos resultados obtidos com o crescimento da microalga <i>S. obliquus</i> e da levedura <i>R. toruloides</i> , enquanto culturas puras e em condições de esterilidade, em efluente e em efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar .....	88
Tabela 4.8: Resumo dos resultados obtidos com o crescimento da microalga <i>S. obliquus</i> e da levedura <i>R. toruloides</i> , enquanto cultura mista, em efluente e em efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar. Correspondentes aos ensaios até 60 g/L de açúcares totais no meio, a 10 g/L de açúcares totais em condições de esterilidade e de não esterilidade, e ao estudo do tratamento sequencial .....	89

## Lista de Símbolos

- a: Área específica para a transferência de massa
- A: Volume de titulante necessário à titulação do branco
- $A_i$ : Área do pico  $i$
- AG: Ácidos Gordos
- AGV: Ácidos Gordos Voláteis
- AT: Açúcares Totais
- B: Volume de titulante necessário à titulação da amostra
- C17:0: Ácido heptadecanóico
- CBO: Carência Bioquímica de Oxigênio
- CF: Citómetro de Fluxo
- CFDA: Carbofluoresceína diacetato
- CG: Cromatografia Gasosa
- COT: Carbono Orgânico Total
- CQO: Carência Química de Oxigênio
- DO: Densidade Óptica
- $DO_{540\text{ nm}}$ : Densidade Óptica a 540 nm
- $DO_{600\text{ nm}}$ : Densidade Óptica a 600 nm
- ER: Eficiência de Remoção
- F: Frutose
- FL1, FL2, FL3, FL4: Fotomultiplicadores de Fluorescência
- $f_r$ : Factor de Resposta
- FSC: *Forward light scattering*
- G: Glucose
- HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- IP: Iodeto de Propídio
- IR: Índice de Refracção
- ISA: Solução Ajustador de Força Iónica
- $k_d$ : Taxa específica de morte celular

$K_L$ : Coeficiente global de transferência de massa

$K_L a$ : Coeficiente volumétrico de transferência de massa

m: Massa

M: Molaridade

NTK: Nitrogénio Total de Kjeldahl

$N - NH_3$ : Nitrogénio Amoniacal

P: Fósforo

$P_2O_5$ : Pentóxido de Fósforo

PBS: Solução tampão fosfato

PI: Padrão Interno

$PO_4^{3-}$ : Fosfatos

$P - PO_4^{3-}$ : Fósforo presente em fosfatos

PSB: Peso Seco de Biomassa

PSIC: Peso Seco Isento de Cinzas

$P_{X,máx}$ : Produtividade Máxima de Biomassa

S: Sacarose

SDT: Sólidos Dissolvidos Totais

SSC: *Side light scattering*

SST: Sólidos Suspensos Totais

ST: Sólidos Totais

$V_S$ : Volume de amostra

VLE: Valores Limite de Emissão

X: Concentração de Biomassa

$X_{máx}(DO_{540\text{ nm}})$ : Concentração máxima de Biomassa, em absorvância, lida a 540 nm

$X_{máx}(DO_{600\text{ nm}})$ : Concentração máxima de Biomassa, em absorvância, lida a 600 nm

$\mu$ : Taxa específica de crescimento

## 1. Objectivos

Este trabalho tem como principal objectivo estudar o tratamento biológico de efluentes secundários da indústria cervejeira, utilizando culturas puras da microalga *Scenedesmus obliquus* e da levedura *Rhodospiridium toruloides*, bem como de uma cultura mista dos dois microrganismos, tirando partido da simbiose resultante dos modos nutricionais complementares destes, para melhorar a eficiência do tratamento do efluente e a produção de produtos lipídicos intracelulares (lípidos de reserva e lípidos de membrana), tendo em conta que ambos os microrganismos são oleaginosos.

Para atingir esse objectivo, o trabalho iniciou-se com a optimização da concentração de açúcares totais, por adição de melação de cana-de-açúcar aos meios das culturas puras e mistas sob condições de esterilidade, de forma a obter-se a máxima eficiência do tratamento do efluente, bem como a máxima produção de biomassa e de produtos lipídicos. A suplementação do meio com uma fonte de carbono é essencial, uma vez que a levedura *Rhodospiridium toruloides* é um microrganismo heterotrófico obrigatório e a carga em carbono do efluente secundário da indústria cervejeira não é suficiente ao seu desenvolvimento. Contudo, o melação de cana-de-açúcar é um substrato complexo, pelo que a suplementação do meio com este tem associado o aumento da carga do efluente em contaminantes, nomeadamente em carbono orgânico, em nitrogénio e em fósforo. Assim, este trabalho tem também como objectivo perceber se o tratamento do efluente e a produção lipídica por suplementação do meio com melação de cana-de-açúcar são objectivos compatíveis.

Foi também realizado um ensaio de tratamento do efluente utilizando uma cultura mista, mas em condições não estéreis, para comparação com o ensaio realizado sob condições de esterilidade, tendo em conta os custos energéticos mais baixos desta última condição.

## 2. Introdução

### 2.1. Ciclo Hidrológico Global e Distribuição da Água na Terra

Na Terra a água distribui-se por três principais reservatórios: os oceanos, os continentes e a atmosfera, entre os quais circula continuamente, pelo ciclo hidrológico. Cobre 2/3 da superfície do planeta, correspondendo aproximadamente a  $1360 \times 10^{15} m^3$ , o equivalente ao volume de uma esfera com 1360 km de diâmetro (Alves, 2007a).

A quantidade total de água na Terra é constante, no entanto a sua distribuição e qualidade tem sofrido bastantes alterações ao longo do tempo (Alves, 2007a).

É indispensável preservar e controlar a disponibilidade da água e a sua qualidade, considerando-a sempre como um bem precioso que deve ser conservado e utilizado racionalmente. Alterar a qualidade da água implica pôr em causa a vida do Homem e de todos os outros seres vivos que dela dependem. É, por isto, essencial preservar as águas, superficiais e subterrâneas, de contaminação (Derisio, 2012), nomeadamente evitando descargas de efluentes domésticos, agrícolas e industriais no ambiente, que desencadeiam graves problemas de poluição. De facto, a poluição da água é um grave problema da actualidade que levanta questões de saúde pública e que tem levado à procura de tratamentos adequados dos efluentes que são descarregados no meio ambiente (Abdel-Raouf et al., 2012).

### 2.2. Efluentes Industriais

Efluente é qualquer água de origem doméstica ou industrial que contenha contaminantes, sendo alguns bastante prejudiciais para os humanos e para o ambiente (AL-Rajhia et al., 2012).

Muitas são as indústrias, a nível mundial, a produzir largas quantidades de efluente. Estes efluentes provenientes dos processos industriais, em especial da indústria agroalimentar, contêm altas concentrações de carbono (C) e nitrogénio (N) (AL-Rajhia et al., 2012; Raposo et al., 2010), na forma de compostos orgânicos e inorgânicos. O carbono orgânico está presente na forma de hidratos de carbono, ácidos gordos, proteínas, aminoácidos e ácidos voláteis (Abdel-Raouf et al., 2012). Os constituintes inorgânicos incluem altas concentrações de sódio, cálcio, potássio, magnésio, cloro, enxofre, fosfatos, bicarbonatos, sais de amónio e metais pesados (Abdel-Raouf et al., 2012). Isto obriga ao tratamento dos efluentes, de forma a que possam ser descarregados sem qualquer impacto ambiental ou novamente usados nos processos (Raposo et al., 2010).

### 2.3. Tratamento de Efluentes Industriais

#### 2.3.1. Parâmetros de Qualidade

Dependendo da contaminação, existem numerosos processos que podem ser utilizados para tratar os efluentes, de forma a que, no final, se obtenha água com uma qualidade tal que possa ser reutilizada ou descarregada no ambiente, sem causar prejuízos. A qualidade de uma água é aferida através da quantificação de algumas das suas propriedades físico-químicas e microbiológicas, seguida da comparação com valores limite que devem ser respeitados (Alves, 2007b). Sendo que os valores limite de qualidade de uma água legalmente exigidos, são a expressão quantitativa das características

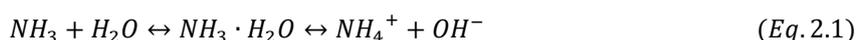
mínimas dessa água, quando destinada ao abastecimento público (Alves, 2007b) ou à descarga na natureza.

De entre os parâmetros de qualidade da água, quando o destino do efluente tratado é a reutilização em processos industriais e/ou a descarga na natureza, deve-se dar especial destaque aos parâmetros relativos a substâncias indesejáveis, nomeadamente: o *N* amoniacal ( $N - NH_3$ ), o *N* total de Kjeldahl (NTK), o *C* orgânico total (COT) e o *P* total. Sendo que para que as águas residuais possam ser descarregadas na natureza, estes parâmetros têm de estar dentro de valores limite específicos legalmente exigidos (Tabela 2.1) (“Decreto-Lei nº 236/98 , de 1 de agosto de 1998,” 1998).

Tabela 2.1: Valores limite de emissão (VLE) na descarga de águas residuais (“Decreto-Lei no 236/98 ,1 agosto 1998,” 1998).  $CBO_5$  é a Carência Bioquímica de Oxigénio ao 5º dia, e a 20°C;  $CQO$  é a Carência Química de Oxigénio; e SST é Sólidos Suspensos Totais.

Valores Limite de Emissão (VLE) na descarga de águas residuais na natureza		
Parâmetros	Expressão dos Resultados	VLE
pH	Escala de Sorensen	6,0-9,0
$CBO_5, 20^\circ C$	$mgO_2/L$	40
$CQO$	$mgO_2/L$	150
$SST$	$mg/L$	60
		10
Fósforo Total	$mgP/L$	3 (em águas que alimentem lagoas ou albufeiras) 0,5 (em lagoas ou albufeiras)
Nitrogénio Amoniacal	$mgNH_4/L$	10
Nitrogénio Total	$mgN/L$	15

O  $N - NH_3$  é uma substância tóxica, indicativa de contaminação derivada da degradação da matéria orgânica nitrogenada ou da descarga de efluentes industriais com amoníaco (Alves, 2007c).



NTK é o conjunto do *N* orgânico e do  $N - NH_3$ , e inclui compostos como: proteínas, péptidos, ácidos nucleicos e ureia. É importante na avaliação do *N* disponível para as actividades biológicas. A concentração de NTK em rios não sujeitos a excesso de descargas orgânicas varia de 0,5 – 1  $mg/L$ , e os níveis de *N* orgânico variam desde algumas centenas de  $\mu g/L$  em águas de lagos, até cerca de 20  $mg/L$  em efluentes limpos (Alves, 2007c).

COT é representativo dos compostos orgânicos presentes nas águas residuais, ou efluentes, passíveis de sofrer oxidação a dióxido de carbono ( $CO_2$ ) por processos biológicos ou químicos. Uma vez sendo a oxidação biológica, então a análise é designada por Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO); se a oxidação for química, então a análise é designada por Carência Química de Oxigénio (CQO). Assim, COT é correlacionável com as CBO e CQO (Alves, 2007c).

O *P* total nas águas está relacionado com o desenvolvimento de algas e plantas aquáticas. Pode ter origem natural, como resultado da decomposição da matéria biológica e da lixiviação, ou artificial como constituinte de adubos e detergentes presentes nas águas (Alves, 2007c).

### 2.3.2. Tratamento Convencional de Efluentes

A Figura 2.1 mostra as várias etapas unitárias que integram o processo convencional de tratamento de águas residuais.

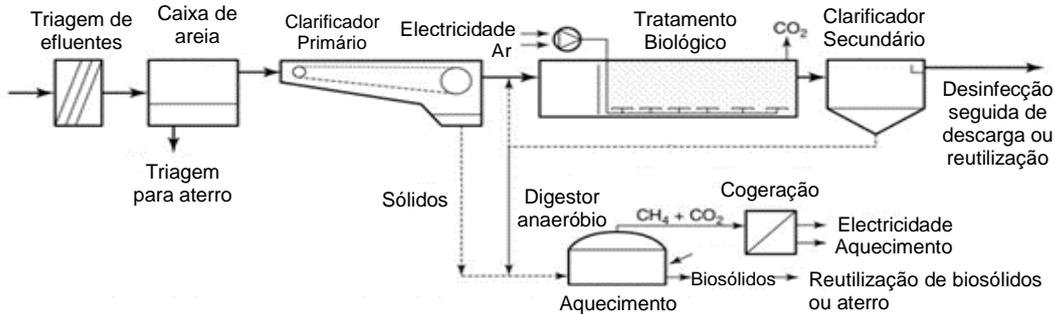


Figura 2.1: Layout de um tratamento convencional típico de efluentes (adaptado de Mihelcic & Zimmerman, 2010).

Os passos envolvidos no tratamento convencional de efluentes industriais são: (i) pré-tratamento, (ii) tratamento primário, (iii) tratamento secundário, e (iv) tratamento terciário (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

O pré-tratamento prepara as águas residuais para o tratamento e é usado com o objectivo de remover óleos e partículas flutuantes e/ou suspensas. O pré-tratamento de efluentes industriais pode adicionalmente requerer a remoção do  $N - NH_3$ , dos ácidos e/ou bases presentes e dos metais pesados, através de um pré-tratamento físico-químico (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

O objectivo do tratamento primário é a remoção de sólidos por meio de processos de separação sólido-líquido. Ocorre num tanque de decantação, ou tanque de sedimentação, no qual os sólidos se depositam no fundo. Esta etapa do tratamento remove aproximadamente 60% dos sólidos suspensos totais (SST), 30% da CBO e 20% do  $P$ . Na sua maioria, a CBO e o  $P$  removidos são parte integrante dos SST. A esta fase do processo podem ser adicionados coagulantes, de forma a tornar a sedimentação mais eficiente. O efluente clarificado que sai do tratamento primário segue para o tratamento secundário (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

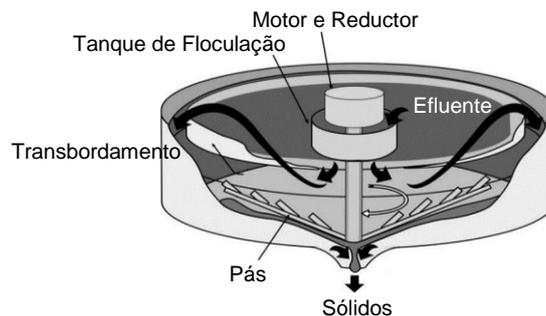


Figura 2.2: Corte transversal de um tanque de sedimentação circular (adaptado de Mihelcic & Zimmerman, 2010).

O efluente que chega ao tratamento secundário (clarificação) já sofreu remoção significativa das partículas suspensas, no entanto, ainda apresenta elevada carga de CBO, devido à abundância de matéria orgânica dissolvida. O tratamento secundário é um tipo de tratamento biológico e, como tal, utiliza microrganismos. Existe duas formas de tratamento biológico, que diferem entre si na forma como

os microrganismos e os resíduos são postos em contacto: nos reactores de crescimento suspenso, há mistura dos microrganismos com o efluente a tratar; nos reactores de crescimento fixo, os microrganismos estão ligados a um suporte estático enquanto o efluente móvel passa pelos microrganismos (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

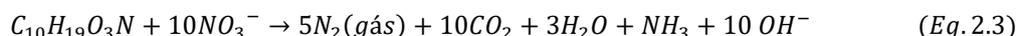
No tratamento secundário ocorre a remoção do *N* e do *P* presentes no efluente.

O *N* é removido por um processo de nitrificação/desnitrificação, que ocorre em condições de aerobiose e anóxia, respectivamente. A etapa de nitrificação ocorre na presença de oxigénio ( $O_2$ ), na qual bactérias aeróbias convertem a amónia ( $NH_4^+$ ) em nitrito ( $NO_2^-$ ) e este em nitrato ( $NO_3^-$ ). A reacção geral destes dois processos é apresentada na Eq. 2.2 (Mihelcic & Zimmerman, 2010).



Para que o processo de remoção do *N* seja completo, é essencial a presença de várias bactérias, nomeadamente bactérias facultativas que façam a conversão do  $NO_3^-$  a gás nitrogénio ( $N_2$ ). No entanto, algum do gás nitrogénio produzido é sob a forma de óxidos de nitrogénio, como o  $N_2O$ , que é um gás de efeito de estufa (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

Nesta fase anaeróbia, o  $NO_3^-$  produzido no processo de nitrificação vai ser reduzido (agindo como aceitador de electrões) e a carga orgânica biodegradável presente no efluente (CBO e CQO) vai ser oxidada (dadora de electrões) a  $CO_2$ , e nova biomassa, de acordo com a Eq. 2.3 (Mihelcic & Zimmerman, 2010).



Esta etapa do processo é anóxica, uma vez que a presença de  $O_2$  dissolvido inibe a redução do  $NO_3^-$  (Mihelcic & Zimmerman, 2010).



Figura 2.3: Configuração de um reactor biológico para remoção do nitrogénio (adaptado de Mihelcic & Zimmerman, 2010).

A remoção do *P* pode ser feita por processos químicos ou biológicos. No tratamento químico, são adicionados compostos químicos como alumínio ( $Al_2(SO_4)_3$ ), sulfato férrico ( $Fe_2(SO_4)_3$ ) e cloreto férrico ( $FeCl_3$ ), para remoção do *P* por precipitação (Eq. 2.4). Esta adição é efectuada tipicamente durante o tratamento primário ou secundário (Mihelcic & Zimmerman, 2010)(JR & JB, 2010).



No tratamento biológico, a remoção do *P* ocorre no biorreactor aeróbico, no qual o *P*, na forma de fosfatos, é armazenado internamente por microrganismos. Daqui resulta a remoção do *P* do efluente

por conversão do fosfato dissolvido em *P* armazenado nas células microbianas. As células são depois removidas no clarificador secundário (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

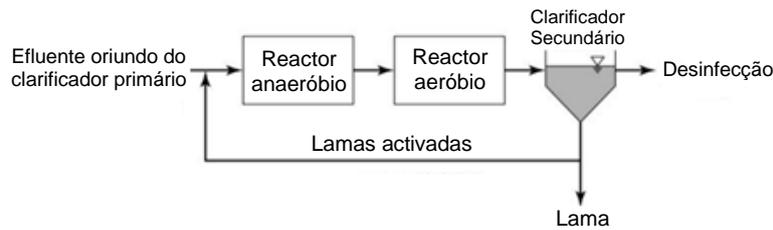


Figura 2.4: Esquema de um reactor biológico para remoção do *N* e do *P* durante o processo de tratamento secundário de um efluente (adaptado de Mihelcic & Zimmerman, 2010).

O tratamento terciário, desinfecção, tem como objectivo a remoção de organismos patogénicos. Ocorre por adição de agentes químicos, como o hipoclorito de sódio líquido, o dióxido de cloro, ou gás cloro; ou por agentes físico-químicos, como a radiação ultravioleta (Mihelcic & Zimmerman, 2010).

## 2.4. Indústria Cervejeira

### 2.4.1. Processo de Produção

De entre as indústrias alimentares, o sector da indústria cervejeira detém uma posição económica estratégica, com uma produção mundial anual superior a 1,34 *biliões de hl* em 2002 (Fillaudeau et al., 2006). A cerveja é a quinta bebida mais consumida no mundo, com um consumo médio de 9,6 *L/capita* (valor que considera apenas a população com idade superior a 15 anos) (Olajire, 2012).

Durante a produção, a cerveja é sujeita alternadamente a reacções químicas e bioquímicas (punção, fervura, fermentação e maturação), bem como a separações sólido-líquido (Figura 2.5). Consequentemente, o consumo de água, a produção de efluentes e a geração de resíduos sólidos são grandes problemas da indústria cervejeira, cuja resolução implica gastos e investimentos acrescidos. Assim sendo, promissoras alternativas biológicas à redução do consumo de água e de produção de resíduos sólidos, bem como à diminuição dos respectivos custos de tratamento, constituem um desafio que poderá ser uma oportunidade de evolução da indústria cervejeira (Fillaudeau et al., 2006).

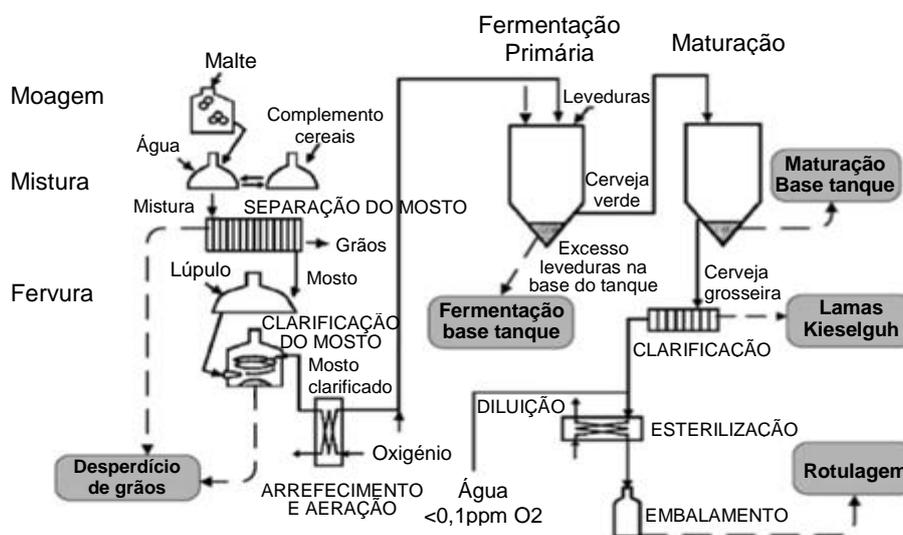


Figura 2.5: Processo de produção de cerveja e dos principais resíduos (adaptado de Fillaudeau et al., 2006).

## 2.4.2. Efluentes da Indústria Cervejeira

O processo de fermentação da produção da cerveja, além de requerer intensivos consumos de energia, requer o uso de grandes quantidades de água (Olajire, 2012).

A água, além de constituir 90 – 95% (em massa) da cerveja, é utilizada em quase todas as etapas do processo de produção da mesma, nomeadamente para lavagens, limpeza, etapas de esterilização, aquecimentos e arrefecimentos de processos, instalações sanitárias, etc. (ver Tabela 2.2), sendo um consumível muito importante no processo. O consumo de água depende do tipo e do volume da cerveja, da existência de máquinas de lavagem de garrafas, do tipo de embalagem e pasteurização, do sistema de limpeza usado e do tipo e idade do equipamento empregado, variando o seu consumo entre 0,4 a 1 m<sup>3</sup>/hL de cerveja produzida (Olajire, 2012).

Tabela 2.2: Consumo de água pelos diferentes processos da indústria cervejeira (Olajire, 2012).

Passos	Consumo Específico de Água (m <sup>3</sup> /hL de cerveja produzida)	
	Medição numa indústria cervejeira alemã	Literatura <sup>a</sup>
Armazenamen	0,13 – 0,23	0,17 – 0,26
Fermentação	0,03 – 0,05	0,04 – 0,08
Armazenamen	0,02 – 0,07	0,01 – 0,06
Filtração	0,03 – 0,11	0,01 – 0,08
Engarrafament	0,06 – 0,16	0,09 – 0,10
Barris	0,01 – 0,06	0,01 – 0,12
Diversos	0,2 – 0,204	0,03 – 0,40
Total Processo	0,49 – 0,89	0,47 – 1,33

<sup>a</sup>Estimativa

Excluindo a água que é usada no processo como ingrediente da cerveja (como constituinte principal), toda a restante água consumida é, em quantidade, muito semelhante à quantidade de efluente que é produzido, uma vez que a maior parte dessa água usada acaba como efluente, em parte devido ao alto teor de matéria orgânica que carrega (Olajire, 2012). Geralmente estes efluentes apresentam uma elevada CQO, devido à presença de compostos orgânicos como açúcares, amido, etanol e ácidos gordos voláteis, assim como uma elevada CBO (Simate et al., 2011). Em contrapartida, os efluentes da indústria cervejeira não são tóxicos e, por norma, não contêm quantidades apreciáveis de metais pesados (Olajire, 2012).

Estima-se que se produz 3 a 10 litros, aproximadamente, de efluente por cada litro de cerveja que é produzido. Assim, o uso de água nesta indústria é de considerável importância, não só em termos de consumo de água, como de produção de efluentes (Olajire, 2012).

Na Tabela 2.3 estão resumidas as principais características físico-químicas típicas de um efluente de uma indústria cervejeira (Simate et al., 2011).

Tabela 2.3: Características físico-químicas de um efluente de indústria cervejeira na Índia, em que CQO é a carência química de oxigênio, CBO a carência bioquímica de oxigênio, AVG refere-se aos ácidos gordos voláteis, NTK ao nitrogênio total de Kjeldahl, ST aos sólidos totais, SST aos sólidos suspensos totais, e SDT aos sólidos dissolvidos totais (Simate et al., 2011).

Parâmetro	Valor
pH	3 – 12
Temperatura (°C)	18 – 40
CQO (mg/L)	2000 – 6000
CBO (mg/L)	1200 – 3600
CQO/CBO rácio	1,667
AGV (mg/L)	1000 – 2500
Fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) (mg/L)	10 – 50
NTK (mg/L)	25 – 80
ST (mg/L)	5100 – 8750
SST (mg/L)	2901 – 3000
SDT (mg/L)	2020 – 5940

### 2.4.3. Tratamento de Efluentes da Indústria Cervejeira

As características físico-químicas dos efluentes da indústria cervejeira variam muito, conforme se pode ver na Tabela 2.3, dependendo de factores como o tipo de cerveja produzida e os processos de onde derivam (Driessen & Vereijken, 2003). Além disso, por comparação das Tabelas 2.1 e 2.3, conclui-se que estes efluentes requerem tratamento. Nos casos em que os efluentes não são descarregados em esgotos municipais para tratamento, é necessário que passem por tratamento primário e secundário; nos casos em que são descarregados nos esgotos municipais para tratamento, o pré-tratamento pode ser feito de forma a reduzir a carga de contaminação do efluente para os níveis exigidos pela estação de tratamento municipal (Simate et al., 2011).

O pré-tratamento pode ser feito por métodos físicos, químicos, biológicos, ou por uma combinação destes três métodos. A Tabela 2.4 mostra as operações unitárias incluídas em cada um dos métodos referidos (Simate et al., 2011).

Tabela 2.4: Processos e operações unitárias de tratamento de efluentes industriais (Simate et al., 2011).

Operações Unitárias Físicas	Triagem
	Fragmentação
	Equalização de Fluxo
	Sedimentação
	Flutuação
Operações Unitárias Químicas	Filtração Granular
	Precipitação Química
	Adsorção
	Desinfecção
Operações Unitárias Biológicas	Cloração
	Outras Aplicações Químicas
	Processos de Lagoas Activadas
	Lagoas Arejadas
	Filtros de gotejamento
	Contactores Biológicos Rotativos
	Lagoa de Estabilização
Digestão Anaeróbia	
Remoção Biológica de Nutrientes	

É importante ter em conta que o tratamento e a descarga dos efluentes de uma indústria cervejeira têm associados custos muito elevados e, como tal, são aspectos a ter em conta na operação de uma fábrica cervejeira.

## **2.5. A razão de se apostar em tratamentos biológicos que envolvam microalgas**

### **2.5.1. Biotratamentos com Microalgas**

Alguns graves problemas ambientais globais, como as alterações climáticas e o aquecimento global, resultam do aumento das emissões dos gases de efeito de estufa, como o metano e os óxidos de nitrogénio (também libertados pelo tratamento convencional de efluentes); no entanto, o  $CO_2$  é, sem dúvida, um dos gases mais prejudiciais (Bhakta et al., 2015). Várias acções têm sido feitas de forma a reduzir as emissões deste gás para a atmosférica, sendo que uma das soluções mais promissoras para a redução das emissões de  $CO_2$ , consiste na conversão deste gás em matéria orgânica através de processos biológicos (Bhakta et al., 2015). A fotossíntese tem sido reconhecida como uma forma de fixação do  $CO_2$  antropogénico, e as algas têm sido identificadas como agentes fotossintéticos com elevadas velocidades de crescimento e, conseqüentemente, de fixação de  $C$ , permitindo obter resultados muito superiores aos conseguidos com plantas terrestres (Bhakta et al., 2015).

Estes factos têm levado a um crescente interesse por tratamentos biológicos de efluentes que envolvam algas e microalgas, devido às vantagens que estes apresentam em relação aos processos de tratamento físico-químicos convencionais e aos tratamentos biológicos que não envolvam microalgas, devido à dificuldade em remover eficiente e simultaneamente o  $N$  e o  $P$  totais (Arbib et al., 2014).

De facto, vários estudos demonstram que os tratamentos biológicos de efluentes com microalgas permitem simultaneamente a remoção do  $C$  orgânico e dos nutrientes inorgânicos, tanto do  $N$  como do  $P$  total (Arbib et al., 2014). O  $C$  orgânico é convertido em componentes celulares, como hidratos de carbono e lípidos, pelo metabolismo celular das microalgas. O  $N$  e o  $P$  inorgânicos são assimilados pelas microalgas para crescimento celular. Isto torna a aplicação das microalgas no tratamento de efluentes, um método eficiente e económico (Ma et al., 2017).

Tal como já foi referido, no tratamento convencional de efluentes o  $N$  e o  $P$  são, na grande maioria das vezes, removidos por duas etapas separadas: numa das etapas o  $N$  é convertido a  $N_2$ , através de processos de nitrificação-desnitrificação; o  $P$  é removido numa outra etapa, através da sua precipitação sob a forma de sais de metal (Beuckels et al., 2015). Por outro lado, as microalgas absorvem simultaneamente os dois nutrientes para produção de biomassa, removendo-os do efluente e reciclando-os, produzindo compostos intracelulares que podem ser convertidos em energia e/ou em produtos de alto valor (Beuckels et al., 2015). Esta vantagem é muito atractiva quando existe a necessidade de aumentar a eficiência energética dos processos (Beuckels et al., 2015).

As microalgas, além de serem muito robustas e de poderem crescer de forma praticamente ilimitada sob condições adequadas, são dos organismos que fornecem mais oxigénio ( $O_2$ ) ao planeta (Santos, 2013) contribuindo para a mitigação dos gases de efeito de estufa, pela sua capacidade de realizar a fotossíntese, através da qual convertem o  $CO_2$  em glicose e  $O_2$ , reduzindo os níveis de  $CO_2$  na atmosfera

(Figura 2.6) (AL-Rajhia et al., 2012; Defanti et al., 2010; Nelson & Cox, 2011a). Assim, em comparação com os tratamentos convencionais de efluentes, a utilização de microalgas nos tratamentos biológicos tem a vantagem de reduzir a emissão destes gases (Pittman et al., 2011).

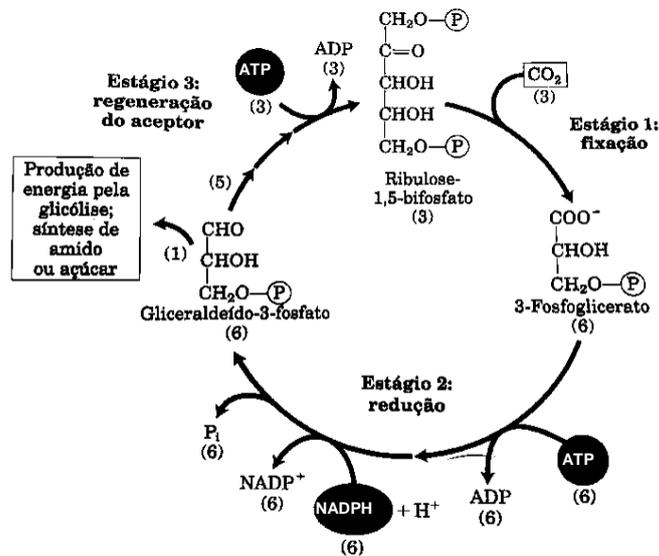


Figura 2.6: Ciclo de Calvin (adaptado de Nelson & Cox, 2011c).

A utilização de microalgas no tratamento de efluentes têm ainda inúmeras outras vantagens, como o baixo custo efectivo do processo, a reduzida necessidade energética associados à sua produção (se cultivadas em *raceways*), a remoção dos metais pesados presentes nos efluentes (especialmente nos efluentes de origem industrial), o facto de as algas acumularem no seu interior mais de 70% do seu peso seco em óleo, e poderem ser cultivadas em meios que não podem ser utilizados por culturas vegetais (AL-Rajhia et al., 2012). Além de todas estas vantagens, o biocombustível produzido por algas não é tóxico, não contém enxofre e é altamente biodegradável (AL-Rajhia et al., 2012).

A maior dificuldade no tratamento biológico com microalgas, prende-se com as baixas densidades celulares, tipicamente entre 0,5 – 5 g/L, e com as reduzidas dimensões celulares de algumas algas, tipicamente 2 – 40  $\mu\text{m}$  (Brennan & Owende, 2010). O que faz com que não se consigam, por exemplo, produções lipídicas tão satisfatórias, como as que poderiam ser conseguidas se este microorganismo permitisse obter densidades celulares superiores.

As microalgas podem apresentar vários tipos de metabolismo: fotoautotrófico, heterotrófico, fotoheterotrófico e mixotrófico (Abinandan & Shanthakumar, 2015; Papone et al., 2015). A fotoautotrofia envolve o processo de fotossíntese, no qual, utilizando a luz como fonte de energia, ocorre a síntese de moléculas orgânicas a partir de substâncias minerais, como a amónia, o  $\text{CO}_2$ , que é usado como fonte de C, e a água, que ao ser usada como dadora de electrões, é oxidada a  $\text{O}_2$ . A heterotrofia exige fontes de C orgânico, como os açúcares, para obtenção de energia e síntese das biomoléculas essenciais ao metabolismo. O crescimento de microalgas mixotróficas conjuga simultaneamente o fotoautotrofismo com o heterotrofismo, utilizando como substratos o  $\text{CO}_2$  e compostos orgânicos (Abinandan & Shanthakumar, 2015; Papone et al., 2015).

### 2.5.2. Relação Simbiótica entre Microalgas e Leveduras

A grande maioria das microalgas vive em relação simbiótica com outros organismos (Richmond, 2004).

Numa cultura mista duas ou mais espécies pré-seleccionadas de microrganismos desenvolvem-se em simultâneo. Na cultura mista de microalgas e leveduras (cultura mixotrófica), as microalgas actuam como fonte de  $O_2$ , essencial às leveduras, e as leveduras libertam  $CO_2$  necessário ao metabolismo fotossintético das microalgas (Papone et al., 2015). Isto é possível em sistemas, como os de tratamento de efluentes, em que o crescimento das microalgas é predominantemente efectuado por via fotossintética e, portanto, o  $CO_2$  é consumido pelas microalgas e convertido em compostos orgânicos como fonte de energia química (Quiroz et al., 2015), resultando na produção e libertação de  $O_2$  (Eq. 2.5). Paralelamente, as leveduras consomem  $O_2$  por via heterotrófica, bem como compostos orgânicos, como fonte de  $C$  e de energia química ( $C_wH_xO_yN_z$ ) e como fonte de  $N$  ( $H_gO_hN_i$ ), processo do qual resulta a produção de biomassa (de "forma elementar"  $CH_jO_kN_l$ ), produtos ( $C_mH_pO_qN_r$ ), água e  $CO_2$  (Eq. 2.6), este último necessário ao metabolismo das microalgas (Fonseca & Teixeira, 2007a; Nelson & Cox, 2011a).

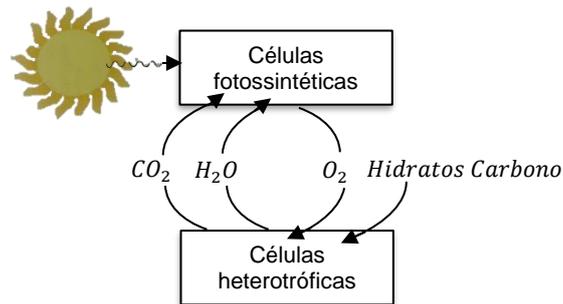
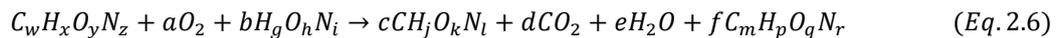
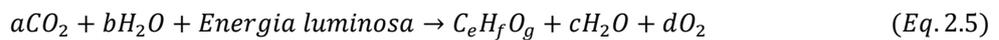


Figura 2.7: Relação entre células fotossintéticas e heterotróficas (adaptado de Nelson & Cox, 2011c).

Assim, uma forma aparentemente fácil de manter a autossustentabilidade de uma cultura num sistema de tratamento de águas, tanto a nível de trocas mássicas como de trocas gasosas, é a utilização de uma cultura mista de microrganismos autotróficos e heterotróficos, como por exemplo, de microalgas e leveduras. Algumas leveduras são capazes de acumular lípidos celulares correspondentes a mais de 70% em peso da sua biomassa, que podem ser extraídos e transformados em biodiesel, favorecendo economicamente o processo de tratamento do efluente (Freitas et al., 2014; Papone et al., 2015).

No caso específico desta simbiose aplicada ao tratamento de efluentes cuja carga orgânica seja baixa, o metabolismo heterotrófico/mixotrófico pode não ter disponível fonte de  $C$  suficiente para se desenvolver. Nestes casos, é necessário ponderar a suplementação do efluente com uma fonte de  $C$  orgânico.

É, contudo, importante ter em conta a viabilidade económica dos processos que envolvem microrganismos, que muitas vezes é limitada pelos custos do meio de fermentação, que chegam a

rondar os 30% dos custos totais de produção (Freitas et al., 2014). Assim, aquando da escolha da fonte de matéria orgânica a suplementar o efluente, é relevante ter em conta esta limitação. Por exemplo, a suplementação do meio de cultura com glucose como fonte de carbono pode aumentar bastante os custos do processo.

### 2.5.3. Melaço de Cana-de-Açúcar como Fonte de Carbono

Uma forma de reduzir os custos associados ao meio de cultura dos microrganismos consiste na selecção de fontes de *C* orgânico abundantes e baratas (Yan et al., 2011). Uma opção economicamente viável e sustentável, é o recurso a subprodutos industriais de valor comercial residual, como é exemplo o melaço de cana-de-açúcar, que é um subproduto da indústria do açúcar. Ainda que economicamente viável, a utilização do melaço só é possível quando se utilizam culturas heterotróficas ou mixotróficas que têm a capacidade de utilizar como fonte de *C*, podendo ser consumida para produção de lípidos intracelulares (Papone et al., 2015). Uma vez que para o crescimento de microrganismos, é necessário que o substrato contenha os nutrientes essenciais ao desenvolvimento da cultura, e preferencialmente que seja simultaneamente economicamente viável (Feltrin et al., 2000).

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto do processo de produção do açúcar, resultante da etapa de centrifugação, sendo que cada tonelada de cana produz cerca de 40 a 60 *kg* de melaço (Feltrin et al., 2000). Contém na sua composição 23 – 26% de água, 47 – 48% de açúcares, 9 – 14% de minerais (Mg, Mn, Al, Fe e Zn) e 8 – 12% de *N* (aminoácidos, proteínas, etc.) (Taskin et al., 2016). Quanto á sua composição em açúcares, o açúcar maioritário é a sacarose, correspondente à sacarose não cristalizada, no entanto apresenta outros açúcares fermentáveis, como a frutose e a glucose, tendo um rendimento de cerca de 150 *kg* de açúcares/ton de talos de cana-de-açúcar. O melaço de cana-de-açúcar tem sido utilizado fundamentalmente como fonte de *C* e energia em meios de cultura (Feltrin et al., 2000).

É considerado um resíduo de fácil manipulação, de reduzidos custos e com grande potencial de aplicação a nível industrial. No entanto, embora o melaço de cana-de-açúcar seja um substrato rico em açúcares fermentáveis e em alguns minerais, é pobre em *N* e noutros minerais essenciais ao crescimento de microrganismos como as microalgas e as leveduras. Neste caso, a sua suplementação pode ser necessária, especialmente com *N* e *P* (Feltrin et al., 2000).

## 2.6. Produtos Intracelulares

### 2.6.1. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos com cadeias de comprimento variado, constituídas por átomos de *C* e hidrogénio (*H*) podendo ter entre 4 a 36 átomos de *C*. A cadeia hidrocarbonatada apolar é responsável pela baixa solubilidade dos ácidos gordos em água. Os ácidos gordos são derivados de hidratos de carbono, e apresentam um estado de oxidação quase tão baixo quanto os hidratos de carbono dos combustíveis fósseis (Nelson & Cox, 2011b).

Cada vez mais se sabe que os combustíveis fósseis não são sustentáveis, quer a nível ambiental quer a nível de mercado, uma vez que além de contribuírem significativamente para a emissão de gases de

efeito de estufa, a sua extracção tem custos cada vez mais elevados e as suas fontes são esgotáveis (Freitas et al., 2014).

Uma alternativa aos combustíveis fósseis são os biocombustíveis, ou seja, combustíveis de origem biológica não fóssil, biodegradáveis e ambientalmente sustentáveis (Defanti et al., 2010). Os ácidos gordos estão entre as matérias-primas alternativas mais atraentes para o desenvolvimento de biocombustíveis (Zhu et al., 2012).

As células microbianas sintetizam ácidos gordos sob duas formas: os triglicéridos, acumulados intracelularmente como materiais de reserva; e os fosfolípidos constituintes das membranas celulares fosfolipídicas, uma vez que estes apresentam na sua estrutura duas caudas hidrofóbicas de ácidos gordos. Os biocombustíveis são constituídos por uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, resultantes da transesterificação de um triglicérido com uma molécula de metanol ou etanol, respectivamente (Figura 2.8) (Defanti et al., 2010).

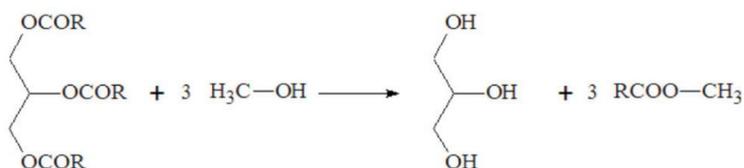


Figura 2.8: Reacção de transesterificação de um triglicérido com uma molécula de metanol. O grupo  $-R$  corresponde às cadeias dos ácidos gordos (Defanti et al., 2010).

### 2.6.2. Produção de Biocombustíveis por Microrganismos

As tecnologias actualmente usadas para obtenção de biocombustíveis a partir da produção de lípidos por plantas oleaginosas são limitadas, tanto em termos de capacidade como de taxa de produção (Zhu et al., 2012). Estas limitações podem ser contornadas recorrendo a microrganismos oleaginosos, como as microalgas e as leveduras, que podem ser usadas como matéria prima para produção de biocombustíveis (Freitas et al., 2014). Estes têm-se revelado promissores candidatos à produção de biocombustíveis devido às vantagens que apresentam, designadamente por apresentarem elevadas taxas de crescimento e maior produção de biomassa, em comparação com as culturas terrestres, e por apresentarem composições de ácidos gordos muito semelhantes aos óleos vegetais (Papone et al., 2015).

A acumulação de lípidos por microrganismos ocorre quando há limitação de um nutriente, que não o  $C$ , no meio. Deste modo, o crescimento celular é afectado e o excesso de  $C$  assimilado é usado para síntese de lípidos de reserva. Os lípidos produzidos são acumulados no interior da célula, geralmente na forma de triglicéridos (Rossi et al., 2011).

Actualmente a produção de biocombustível a partir de microrganismos não é economicamente viável, devido aos elevados custos de produção (Freitas et al., 2014). Ainda assim, com a subida dos preços dos combustíveis fósseis, perante o conhecido impacto negativo destes e atendendo à necessidade cada vez maior de se apostar num desenvolvimento sustentável, tem havido um interesse acrescido em reduzir os custos de produção dos biocombustíveis até ao ponto em que estes possam competir no mercado com os combustíveis fósseis (Mata et al., 2014).

Contudo, enquanto a produção de biocombustíveis a partir de microrganismos não for economicamente viável, a sua comercialização está longe de ocorrer. Uma alternativa consiste na co-produção de produtos de valor acrescentado pelas células, em simultâneo com a síntese de lípidos intracelulares, como por exemplo, alguns carotenóides com interesse comercial produzidos por algumas algas e leveduras. Neste caso, o valor de mercado dos carotenóides pode compensar o elevado custo da produção do biodiesel obtido por via microbiana, tornando o processo economicamente sustentável (Park et al, 2011).

Geralmente, a produção de lípidos a partir de leveduras tem vantagens em relação à produção a partir de bactérias, fungos ou microalgas, uma vez que a taxa específica de crescimento e as produtividades em biomassa e em lípidos são mais elevadas em leveduras (Freitas et al., 2014).

## 2.7. Microrganismos utilizados neste trabalho

### 2.7.1. A microalga *Scenedesmus obliquus* ACOI 204/07

*S. obliquus* é uma microalga verde que pertence ao reino Chloroplastida e ao filo Chlorophyta. Embora também possa ser encontrada no solo, é um microrganismo aquático. Tem dimensões microscópicas, de diâmetro entre 5 – 10  $\mu\text{m}$ , é um organismo eucariótico circular unicelular (Becker, 2007) e vive preferencialmente em águas doces e/ou marinhas (AL-Rajhia et al., 2012). É comum formar agregados, normalmente de duas ou quatro células, embora em situações de condições adversas, possa formar colónias de oito células (Lürling, 2003; Singh & Singh, 2014). Tem parede celular hemicelulósica, que lhe confere a rigidez (Becker, 2007). Por norma apresenta reprodução assexuada por esporos, em que a célula-mãe sofre entre 1 a 4 divisões sucessivas, resultando em 2 a 16 células-filhas (Lürling, 2003). O tamanho e o arranjo celulares, a posição, bem como a morfologia da parede celular, não são estáveis, podendo apresentar, em resposta às condições ambientais, diferentes e variadas morfologias para um único genótipo – o que faz com que esta microalga apresente plasticidade fenotípica (Figura 2.9) (Lürling, 2003).

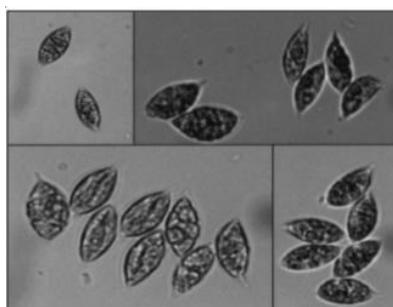


Figura 2.9: Diferentes morfologias apresentadas por *S. obliquus*: unicelular e em colónias de 2,4,6 e 8 células. É um exemplo de plasticidade fenotípica (adaptado de Lürling, 2003).

O *C* é o elemento que compõe cerca de 54% da biomassa de *S. obliquus*, pelo que condições de cultura limitadas por *C* podem influenciar o crescimento e a morfologia celular, resultando em células menores que as observadas em condições de saturação de *C* (Lürling, 2003).

A produção de *S. obliquus* não necessita de adubos químicos e, em massa, pode ser duplicada várias vezes ao dia. A colheita não é sazonal e pode ser diária, e ainda tem a vantagem de não ser uma

matéria-prima alimentícia (Defanti et al., 2010), o que faz com que a sua aplicação em bioprocessos não compita com a alimentação humana. Apresenta altas produtividades de biomassa, lípidos e hidratos de carbono (Singh & Singh, 2014).

Acumula co-produtos intracelulares de alto valor, como pigmentos, aminoácidos e proteínas (Ferreira et al., 2018). É capaz de acumular, aproximadamente e em % de peso seco, 50 – 56% de proteínas, 10 – 17% de hidratos de carbono e 12 – 14% de lípidos (Becker, 2007; Ferreira et al., 2013), podendo ser usada como matéria-prima para bioenergia, como por exemplo para produção de biocombustíveis, designadamente bioetanol, biohidrogénio, biogás e biodiesel (Ferreira et al., 2017; Singh & Singh, 2014). *S. obliquus* é a microalga que apresenta um perfil de ácidos gordos mais adequado à produção de biodiesel, nomeadamente em termos do ácido linolénico e de outros ácidos gordos poli-insaturados (Gouveia & Oliveira, 2009). É ainda usada para biofixação de  $CO_2$ .

É muito versátil, de fácil crescimento e pode ser cultivada em diferentes efluentes e sob distintas condições ambientais (Ferreira et al., 2017). A gama de temperaturas favorável ao crescimento de *S. obliquus* é bastante larga (entre 14 e 30°C), no entanto a temperatura à qual se verifica uma maior produtividade em biomassa é 30°C (Mata et al., 2012; Shamala et al., 1982).

A microalga *S. obliquus* tem sido utilizada para tratamento de efluentes da indústria cervejeira. Segundo Mata et al. (2012), as condições ótimas de crescimento consistem em sujeitar a cultura a uma elevada disponibilidade de  $O_2$ , bem como a elevada intensidade luminosa. Nestas condições atinge-se a concentração máxima de biomassa de 0,9 g biomassa seca/L, ao 9º dia de cultura, e uma elevada taxa de remoção dos contaminantes do efluente (57,5% CQO e 20,8% N total, ao 14º dia, e 56,9% C total, ao 13º dia). É espectável que o pH do meio tenda a aumentar, em resultado do consumo de prótons ( $H^+$ ) durante o processo de fotossíntese (Figura 2.6).

### 2.7.2. A levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921

Taxonomicamente a espécie *R. toruloides* classifica-se como pertencendo ao reino Fungi, ao filo *Basidiomycota*, à classe *Microbotryomycetes*, à ordem *Sporidiobolales* e ao género *Rhodospiridium*.

A levedura oleaginosa *R. toruloides* NCYC 921, conhecida por “levedura cor-de-rosa”, é uma fase anamórfica da espécie *Rhodotorula glutinis*, é não patogénica e tem sido descrita como uma potencial produtora de óleos para a produção de biocombustíveis. É ainda referida como uma promissora produtora de carotenóides de interesse comercial (Zhu et al., 2012; Freitas et al., 2014), podendo acumular lípidos intracelulares em teores superiores a 70% do seu peso seco (Zhu et al., 2012). Apresenta ainda a vantagem de ser tolerante a vários compostos inibitórios presentes em hidrolisados de biomassa, o que lhe confere um elevado potencial biotecnológico na utilização desses materiais para várias aplicações (Zhu et al., 2012).

Dias et al. (2016) estudaram o efeito do pH do meio de cultura no crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. toruloides* NCYC 921, e reportaram que o pH óptimo de crescimento (em termos de taxa de crescimento e de produção de biomassa e lípidos) é 4.0. A produção de biomassa e lípidos é máxima à temperatura de 30°C e à agitação de 150 rpm (Silva et al., 2014).

## 2.8. Modo de Operação de um Bioreactor

O modo de alimentação de um reactor biológico pode ser feito de três formas: descontínua, semi-contínua ou contínua (Fonseca & Teixeira, 2007a), sendo o modo de operação dependente das necessidades da cultura microbiana e do bioprocesso em causa. Para crescimentos de microalgas, o método mais usado é a cultura em descontínuo (Richmond, 2004). Na operação em descontínuo, o meio de cultura com todos os nutrientes e o inóculo são adicionados ao reactor no arranque do processo, e a remoção dos produtos ocorre unicamente no fim da fermentação (Fonseca & Teixeira, 2007b). Assim, a operação em descontínuo tem associado o esgotamento de nutrientes e o aumento da concentração dos produtos excretados pelas células ao longo do tempo de cultura, nomeadamente de produtos tóxicos, uma vez que não existe entradas nem saídas do reactor.

Independente do modo de operação, a preparação de um bioreactor inclui a sua inoculação com o microrganismo que vai executar a reacção bioquímica pretendida. A preparação do inóculo deve ser tal que, na altura da inoculação, as células estejam totalmente viáveis e perfeitamente adaptadas às condições do bioreactor. Assim, é importante que, aquando da inoculação, as células estejam na fase exponencial do crescimento, e a composição do meio do pré-inóculo não difira muito das condições de crescimento do reactor (Fonseca & Teixeira, 2007b)

### 2.8.1. Curvas de Crescimento em Descontínuo

Durante o desenvolvimento de uma cultura microbiana é possível monitorizar a densidade celular através de métodos directos (como a contagem de células) ou de métodos indirectos (como a espectrofotometria), podendo representar-se graficamente o crescimento da cultura ao longo do tempo (Teles et al., 2013). Assim, uma curva de crescimento representa o crescimento celular de uma cultura que pode ser apresentado em número de células ou em concentração de massa celular, durante um determinado intervalo de tempo (Richmond, 2004).

Para uma cultura de microrganismos em descontínuo, a curva de crescimento característica é a apresentada na Figura 2.10, na qual podemos distinguir 4 principais fases: (1) a fase de latência (fase lag), que corresponde à fase de arranque da cultura, durante a qual ocorre a adaptação dos microrganismos ao novo meio de cultura, sendo desejável que seja o mais curta possível. Nesta fase as células não se dividem mas sintetizam componentes celulares de forma a aumentarem a sua massa; (2) a fase exponencial (fase log), caracterizada por não haver limitação do substrato nem acumulação de produtos tóxicos do metabolismo celular, e é durante a qual as células adaptadas ao meio se dividem em intervalos temporais regulares, resultando num crescimento exponencial da população; (3) a fase estacionária, na qual se verifica um equilíbrio entre as taxas de divisão e de morte celular, resultando numa concentração celular total constante, ocorrendo no entanto um aumento da fracção de células não viáveis; e (4) a fase de morte, na qual a taxa de morte celular excede a taxa de divisão celular, resultando num declínio do número de indivíduos da população (Fonseca & Teixeira, 2007b; Hu et al., 2012).

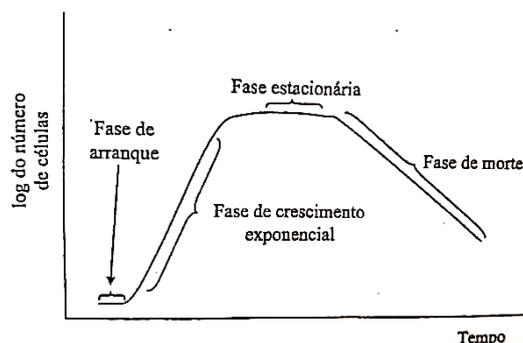


Figura 2.10: Curva de crescimento de uma cultura em descontínuo (adaptado de Fonseca & Teixeira, 2007).

Existem, no entanto, possíveis alterações a esta representação do crescimento da população microbiana com o tempo para operações em descontínuo, nomeadamente: redução do número de células viáveis na fase de latência, em consequência de uma maior dificuldade de adaptação das células do inóculo às novas condições; diauxia, que corresponde ao consumo sequencial de dois substratos, ou seja, após o esgotamento de um substrato ao qual os microrganismos tenham maior preferência, pode ocorrer uma nova fase de arranque, durante a qual a biomassa se adapta a outro substrato; entre outros, como a multiplicação simultânea ou a sobre-avaliação da concentração celular à entrada da fase estacionária (Fonseca & Teixeira, 2007b).

Não havendo correntes de entrada e saída nos sistemas descontínuos, a equação de balanço mássico à biomassa é a apresentada na Eq. 2.7, em que  $X$  é a concentração de biomassa,  $t$  o tempo do desenvolvimento da cultura,  $\mu$  a taxa específica máxima de crescimento celular e  $k_d$  a taxa de morte celular (Fonseca & Teixeira, 2007b).

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X \quad (\text{Eq. 2.7})$$

Para a fase exponencial, tal como referido anteriormente, a taxa de morte celular é desprezável, ou seja,  $k_d \approx 0$ . E, portanto, a Eq. 2.7 pode ser escrita na Eq. 2.8, em que o parâmetro  $X$  correspondente à concentração da biomassa no tempo  $t$  (Fonseca & Teixeira, 2007b).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (\text{Eq. 2.8})$$

### 2.8.2. Transferência de Massa: Agitação e Arejamento

A transferência de massa em reactores biológicos é um dos factores mais importantes de uma conversão bioquímica, uma vez que afecta as taxas de crescimento celular e de conversão dos reagentes em produtos (Fonseca & Teixeira, 2007c).

A agitação de um sistema biológico condiciona as transferências de massa sólido-líquido e gás-líquido, vitais aos processos biológicos. Por outro lado, uma agitação eficiente é essencial para garantir a homogeneidade do sistema. No caso dos reactores biológicos, a existência de gradientes de pH, temperatura ou de concentração de um nutriente, pode impedir a manutenção das condições óptimas de crescimento das células e, consequentemente, diminuir a produtividade do processo. Sendo muitos

os casos nos quais a transferência de massa é ineficiente em resultado de heterogeneidade das concentrações dos solutos, em resultado de uma agitação não eficiente (Fonseca & Teixeira, 2007c).

Em processos de transferência de massa gás-líquido, define-se  $K_L a$  ( $s^{-1}$ ) como sendo o coeficiente volumétrico de transferência de massa, onde  $K_L$  é o coeficiente global de transferência e  $a$  é a área interfacial específica para a transferência de massa. Um dos maiores problemas na transferência de massa gás-líquido, é a transferência dos nutrientes gasosos que apresentam baixa solubilidade, que muito facilmente se tornam limitantes. Em processos aeróbios, a transferência de massa gás-líquido é praticamente sinónimo da transferência de massa do oxigénio das bolhas de ar para o meio de cultura líquido que deve estar disponível no meio enquanto gás dissolvido, o que é um problema devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos. Isto faz com que o contínuo e correcto arejamento da cultura, em associação com uma eficiente agitação, sejam pontos cruciais em bioprocessos (Fonseca & Teixeira, 2007c).

Assim, em processos aeróbios, o fornecimento de oxigénio é dos principais factores na escolha do biorreactor, do correspondente sistema de arejamento e na selecção da taxa de agitação. Por outro lado, o  $K_L a$  depende de vários factores, como o tipo e escala do reactor, o tipo de meio de cultura e de células, a temperatura, o pH, a agitação, etc., o que faz com que além da correcta escolha do reactor e das condições de arejamento e de agitação, seja essencial manter constantes, dentro do possível, as condições operacionais, de forma a tornar os resultados reprodutíveis e comparáveis (Fonseca & Teixeira, 2007c).

## 2.9. Citometria de Fluxo

### 2.9.1. O citómetro de Fluxo

A citometria de fluxo permite detectar células e obter informações detalhadas sobre as suas características, estrutura, comportamentos e funções (Silva et al., 2004).

Um citómetro de fluxo é constituído por um sistema óptico electrónico e pneumático, e inclui cinco elementos: uma (ou mais) fonte(s) de radiação, que normalmente é um laser (emite radiação num comprimento de onda muito específico) mas também pode ser uma lâmpada de mercúrio; uma câmara de fluxo; conjunto de filtros ópticos, que permitem seleccionar intervalos de comprimento de onda específicos; fotodíodos ou fotomultiplicadores, responsáveis pela detecção sensível de radiação fluorescente, e pelo processamento dos sinais com interesse; e ainda um sistema que faz o processamento dos dados recolhidos (Figura 2.11(a)) (Silva et al., 2004).

De forma a atravessar o feixe de radiação emitido pelo laser, a amostra celular (líquida) a analisar é injectada no seio de uma solução salina (sheath fluid) (Figura 2.11(b)). Os dois fluidos atravessam a câmara de fluxo em regime laminar, em consequência da diferença de velocidades. A velocidade de escoamento da solução salina é ajustável e superior à da suspensão celular, o que permite controlar a passagem individual das células da amostra pelo feixe – fenómeno que se designa por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra. Podem ser detectados até 10 000 eventos por segundo.

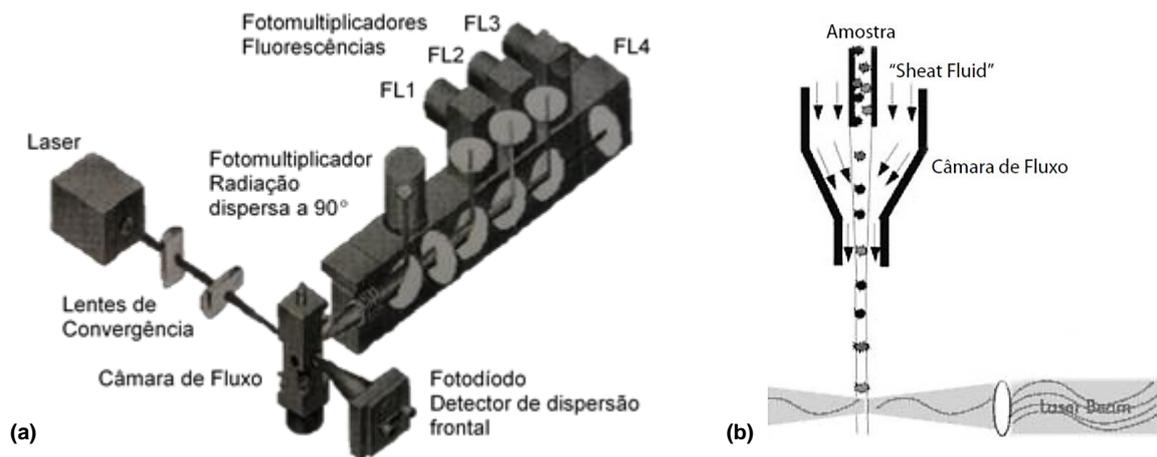


Figura 2.11: (a) Configuração de um citômetro de fluxo; (b) Representação esquemática de uma câmara de fluxo (adaptado de Silva et al., 2004).

Quando o feixe de radiação (com um comprimento de onda definido, geralmente 488 nm no caso de um laser de argônio) intercepta uma partícula da amostra (célula), sofre dispersão frontal e lateral, sendo detectado frontalmente por um fotodiodo colocado no mesmo plano que o laser (geralmente designado por *forward scattering light*, FSC) e, lateralmente, por um fotomultiplicador colocado a 90° em relação ao plano do laser (geralmente designado por *side scattering light*, SSC). A radiação dispersa que é detetada em FSC dá informação sobre a dimensão/tamanho celular, enquanto a radiação dispersa que é detetada em SSC dá informação sobre a complexidade interna da célula (da sua granularidade). Se a célula sintetizar compostos fluorescentes (tais como clorofilas, carotenóides, NAD(P)H, etc.) ou compostos passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes, estes poderão ser detectados por fotomultiplicadores se a fonte de radiação do citômetro emitir no comprimento de onda de excitação desses compostos (Silva et al., 2004).

No processo de excitação/emissão de uma molécula fluorescente, o comprimento de onda de emissão é sempre superior ao comprimento de onda de excitação, pelo que os fotomultiplicadores FL1 (detecta a fluorescência verde,  $530 \pm 30 \text{ nm}$ ), FL2 (detecta a fluorescência amarela,  $585 \pm 42 \text{ nm}$ ), FL3 (detecta a fluorescência laranja-vermelha,  $> 670 \text{ nm}$ ) e FL4 (detecta a fluorescência vermelha,  $660 \pm 16 \text{ nm}$ ) detectam radiação com comprimentos de onda superiores ao do laser (Cutzu et al., 2013; Freitas et al., 2014).

As técnicas tradicionais de monitorização de bioprocessos (densidade óptica, peso seco, capacitância) assentam no pressuposto de que as populações microbianas são homogêneas, e fornecem resultados que correspondem a um valor médio de uma grandeza, respeitante a toda a população. Ao invés, a citometria de fluxo permite a análise individual célula a célula em populações microbianas, revelando heterogeneidades a vários níveis, como por exemplo, em termos de dimensão celular, complexidade interna, estados fisiológicos, etc., o que permite distinguir subpopulações com características e funções semelhantes, dentro da mesma população. Esta técnica tem sido também utilizada para analisar culturas mistas de microrganismos, permitindo diferenciar as diferentes populações microbianas presentes, fornecendo informações detalhadas sobre cada uma delas, em simultâneo, e em tempo

quase real (Cellamare et al., 2010; Hyka et al., 2013). Esta informação, obtida em tempo quase real, permite tomar decisões sobre as condições operacionais de uma cultura, durante a evolução da mesma (por exemplo, alterando a taxa de agitação, a taxa de arejamento, a taxa de alimentação, composição do meio, etc.), de forma a obter-se o rendimento máximo do processo. Tal não é possível quando se utilizam algumas técnicas tradicionais de monitorização de bioprocessos, cujos resultados, além de assentarem em pressupostos incorretos como acima mencionado, apenas estão disponíveis algum tempo após a colheita, muitas vezes depois do bioprocessamento estar concluído (como por exemplo peso seco, contagem de células em placa, etc.) (Nebe-Von-Caron et al., 2000).

A citometria de fluxo é assim uma técnica avançada, com elevado potencial para monitorizar simultaneamente, em tempo quase real e com elevada precisão estatística, inúmeras características e funções celulares, tais como dimensão/granularidade celular, viabilidade celular (através da deteção de várias funções celulares tais como integridade e potencial da membrana celular, atividade enzimática, pH intracelular, espécies reativas de oxigénio, etc.), e alguns produtos intracelulares tais como lípidos (de membrana e de reserva), carotenóides e algumas proteínas (Freitas et al., 2014; Hyka et al., 2013).

### 2.9.2. Avaliação da Integridade da Membrana

A integridade da membrana celular pode ser detectada tanto pela retenção, como pela exclusão dos corantes. Pelo método de retenção de corantes, as células são incubadas com um corante não fluorescente, que penetra a membrana celular e é clivado por enzimas intracelulares, resultando um produto fluorescente que é retido apenas por células com membrana citoplasmática intacta. Este tipo de método nem sempre é fiável, uma vez que existem factores, como uma ineficiente actividade enzimática, um ineficaz transporte do corante para o meio intracelular, ou a expulsão do produto fluorescente por bombas de efluxo, que podem induzir em falso a que a célula tenha a integridade membranar afectada. Isto leva a que se dê preferência aos corantes de exclusão, como o iodeto de propídio (IP) (Silva et al., 2004) ou o SytoxGreen.

O IP é um corante fluorescente que permite estudar a integridade da membrana celular. É excitado a 488 nm e emite radiação fluorescente a comprimentos de onda superiores a 670 nm, pelo que é detectado, predominantemente, pelo detector vermelho, ou seja, em FL3. O IP liga-se às cadeias de ADN, mas não consegue atravessar membranas citoplasmáticas intactas. Assim, quando a célula tem a membrana intacta, o corante IP não consegue penetrar até ao meio intracelular, conseqüentemente a célula não cora e não é detectada pelo fotomultiplicador FL3. Por outro lado, quando a célula tem a membrana comprometida, o corante penetra e a célula é corada, sendo a sua fluorescência detectada pelo detector FL3 (Silva et al., 2004).

O SytoxGreen, à semelhança do IP, também não penetra em membranas intactas, mas atravessa muito facilmente membranas com integridade comprometida. Uma vez dentro da célula, o SytoxGreen liga-se às cadeias dos ácidos nucleicos desta, corando-a. Células coradas com SytoxGreen são detectadas por apresentarem um intenso sinal de fluorescência verde, com um pico de emissão a 523 nm quando excitadas, por um laser de argon que emite radiação a 488 nm. A intensidade do sinal emitido pelas

células mortas, coradas com SytoxGreen, pode ser lida em FL1, o que torna este corante muito útil para a determinação da viabilidade celular em termos de integridade da membrana, por citometria de fluxo (Lebaron et al., 1998).

Concluindo, células coradas com IP ou SytoxGreen, indicam que têm a integridade membranar comprometida.

### **2.9.3. Avaliação da Actividade Enzimática**

O corante mais usado para avaliação da actividade enzimática celular, é a carbofluoresceína diacetato, CFDA. Este composto é excitado a 488 *nm* e detectado a 525 *nm* (em FL1). À semelhança dos corantes usados para avaliação da integridade membranar por métodos de retenção, a CFDA é um composto não fluorescente. Este composto penetra em todas as células por difusão passiva. Se existirem esterases intracelulares, estas hidrolisarão a CFDA, resultando um composto fluorescente que é detectado em FL1. Assim, células que sejam coradas por CFDA revelam a presença de esterases intracelulares. No entanto, é preciso ter presente que, quando uma célula não é corada com CFDA, pode ser devido a dois motivos: (i) ausência de estases; (ii) perda da integridade celular, pelo que a célula não consegue reter o composto fluorescente resultante da actividade de esterases. Por este motivo, é sempre conveniente utilizar a coloração com CFDA em simultâneo com outro corante revelador da integridade celular, como o IP ou o SytoxGreen, de forma a avaliar, em simultâneo, a presença de esterases e da integridade da membrana celular (Silva et al., 2004).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Microrganismos e Pré-Inóculos

Os microrganismos usados neste trabalho foram a levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921, adquirida à National Collection of Yeast Cultures (Norwich, Reino Unido) e a microalga *Scenedesmus obliquus* ACOI 204/07 adquirida à coleção de culturas da Universidade de Coimbra, Portugal.

##### 3.1.1. *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921

A levedura *R. toruloides* NCYC 921 foi mantida em rampas de *Malt Extract Agar Base* (MEA) à temperatura de +4°C. De forma a prevenir possíveis contaminações, a levedura foi repicada em várias placas em MEA, tantas vezes quanto as necessárias até se obter garantidamente uma cultura pura (Figura 3.1). A partir da cultura pura, foram feitas novas rampas (Figura 3.2), as quais foram incubadas (Incubator, SANYO Electric Co., Ltd., Japão) a 30°C durante 72 h e armazenadas a +4°C (Freitas et al., 2014). Para preparação do meio de cultura sólido, pesou-se 25 g de MEA, aos quais se juntou 500 mL de água destilada. Após dissolução completa levou-se a solução à autoclave (Uniclave 88, Portugal), durante 15 min a 121°C. Todas as manipulações assépticas foram realizadas à chama ou em câmara de fluxo laminar (NUAIRE, Biological Safety Cabinets, CLASS II, Plymouth, USA).

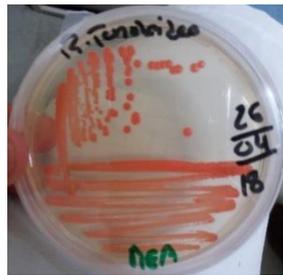


Figura 3.1: Placa de crescimento de *R. toruloides* em meio MEA, para isolamento da cultura.



Figura 3.2: Rampa de crescimento de *R. toruloides* em meio MEA.

A composição do meio de cultura líquido utilizado na preparação do inóculo, foi a seguinte (Yoon & Rhee, 1983): 0,134 g/L de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,73 g/L de  $MgSO_4$ ; 2 g/L de  $Na_2HPO_4$ ; 7 g/L de  $KH_2PO_4$ ; 1 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,5 g/L de extracto de levedura e 35 g/L de glucose (Freitas et al., 2014a). A glucose foi esterilizada separadamente do restante meio de cultura contendo os sais e o extracto de levedura, numa solução concentrada de glucose de 500 g/L (Freitas et al., 2014a). A dissolução dos componentes foi feita em água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv), seguida do acerto do pH a 4,0 das soluções, tendo estas sido posteriormente esterilizadas durante 20 min a 121°C. Após esterilização, as soluções de glucose e de sais foram misturadas assepticamente obtendo-se assim o meio de cultura do pré-inóculo. Os pré-inóculos foram preparados em duplicado em frascos com anteparas de 1 L e rolhas de algodão, previamente esterilizados (Uniclave 88, Portugal) durante 20 min a 121°C, cada pré-inóculo continha 150 mL de meio de cultura e a biomassa de *R. toruloides* removida, com auxílio de uma ansa, de 4 rampas de crescimento da levedura em meio sólido (Figura 3.3), tendo

sido incubados numa agitadora (Unitrom Infors, Suíça) com luz (lâmpadas LED, 12 W). As condições de crescimento foram 30°C e a 150 rpm durante 24h, (Freitas et al., 2014), até atingirem a fase exponencial.



Figura 3.3: Pré-inóculo, em duplicado e em meio líquido, de *R. toruloides*.

### 3.1.2. *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07)

A microalga *S. obliquus* (ACOI 204/07) foi mantida num banco de algas em meio de cultura apropriado (Bristol), à temperatura ambiente e sem agitação. O meio Bristol é preparado nas seguintes proporções: 0,250 g/L de  $\text{NaNO}_3$ ; 0,175 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,075 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,075 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,060 g/L de Fe-EDTA; 0,033 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,025 g/L de  $\text{NaCl}_2$  e 1 mL/L de solução elementos traço de Chu (0,286 g/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,203 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,022 g/L de  $\text{ZnSO}_4$ ; 0,009 g/L de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,006 g/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e 0,005 g/L de  $\text{CuSO}_4$ ) (Ferreira et al., 2017).

Os pré-inóculos foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 ml com rolhas de algodão, previamente esterilizados (Uniclave 88, Portugal) e incubados à temperatura ambiente, a 110 rpm (New Brunswick Scientific Co. EDISON N.J USA) e sob condições de luz artificial (4 lâmpadas Philips 36W) (Figura 3.4), durante 5 dias, de forma a atingirem uma densidade óptica de aproximadamente 0,7 ( $DO_{\lambda=540\text{ nm}}$ ) correspondente à fase exponencial.

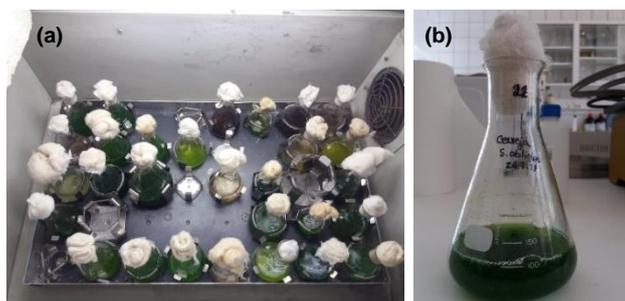


Figura 3.4: (a) Incubadora com culturas de microalga; (b) Pré-inóculo de *S. obliquus*.

## 3.2. Inóculos e Crescimentos

Todos os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer com anteparas de 1 L e rolhas de algodão, contendo 180 ml de meio líquido e 20 mL de inóculo (10% v/v) (Freitas et al., 2014a). Os ensaios foram preparados em duplicado, acompanhados por um ensaio controlo (meio de cultura dos duplicados correspondentes, mas sem inóculo). O meio de cultura usado nos ensaios foi efluente secundário de indústria cervejeira fornecido pela SCC (Sociedade Central De Cervejas E Bebidas S.A, Vila Franca de Xira, Portugal) suplementado com melaço de cana-de-açúcar cedido pela empresa Sidul (Alhandra, Portugal) porque se constatou, em ensaios prévios, que o efluente da indústria cervejeira não continha

carbono (C) suficiente que permitisse crescimento heterotrófico. O efluente já tinha sido sujeito a pré-tratamento, a sedimentação primária e a tratamento secundário por digestão anaeróbia.

Foram feitos ensaios inoculados apenas com *S. obliquus*, nos quais o pH inicial foi ajustado a 7,0 e as culturas foram incubadas a 30°C (Ferreira et al., 2017; Shamala et al., 1982) e a 110 rpm; e ensaios inoculados apenas com *R. toruloides*, nos quais o pH inicial das culturas foi ajustado a 4,0 (Dias et al., 2015), tendo sido posteriormente incubadas a 30°C e a 150 rpm (Silva et al., 2014). Ambos foram incubados (Unitrom Infors, Suíça) sob condições de luz artificial (lâmpadas LED, 12 W).

Para os ensaios com *S. obliquus* foi testado o crescimento apenas em efluente e em efluente suplementado com 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais por adição de melão de cana-de-açúcar. Para os ensaios com *R. toruloides* foi testado o crescimento apenas em efluente e em efluente suplementado com 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais através da adição de melão de cana-de-açúcar, porque se constatou que a levedura apresenta maior tolerância ao açúcar que a microalga.

Depois de estudadas as culturas puras, foram realizados ensaios com culturas mistas, inoculados simultaneamente com *S. obliquus* e *R. toruloides*, nos quais se tentou que o número de células dos dois microrganismos fosse aproximadamente o mesmo no momento da inoculação ( $t = 0 h$ ). Recorreu-se a uma câmara de Neubauer (Zuzi), também conhecida como hemocitómetro, para contagem de células. Em 20 ml de inóculo, a proporção entre os volumes dos dois pré-inóculos foi variável e dependente das correspondentes densidades celulares. Nestes ensaios com culturas mistas, o pH foi inicialmente ajustado a 6,0 e, após inoculação, as culturas foram incubadas (Unitrom Infors, Suíça) a 30°C e a 150 rpm.

Para os ensaios com cultura mista foi testado o crescimento apenas em efluente e em efluente suplementado com 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais através da adição de melão de cana-de-açúcar.

Após otimização da concentração em açúcares totais (10 g/L), foram realizados dois ensaios, um em condição de esterilidade e outro em condição de não esterilidade a fim de se compararem os resultados, e para os quais todas as análises referidas abaixo foram feitas diariamente.

Acertos de pH foram feitos após a preparação dos meios (a cada solução de concentração conhecida de efluente e melão individualmente) com soluções 5M NaOH e 5M HCl. Após acerto do pH e uma vez colocado o volume pré-estabelecido de meio de cultura em cada frasco de ensaio, colocaram-se as rolhas de algodão (devidamente protegidas com papel de alumínio) e levou-se a autoclavar.

Os ensaios decorreram durante 7 a 9 dias, até as células atingirem a fase estacionária. No último dia de ensaio, as culturas foram centrifugadas (Sigma 2-16K, Sartorius, Alemanha), a 9000 rpm e a 5°C durante 10 min. O *pellet* foi congelado para posterior liofilização (Heto PowerDry LL3000 Freeze Dryer, Thermo Scientific, USA, com uma bomba de vácuo Vacuubrand, Alemanha) e análise de ácidos gordos por cromatografia gás-líquido (Bruker SCION 436-GC, Alemanha), e o sobrenadante usado para análise do N – NH<sub>3</sub>, do NTK, do CQO, do P (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e análise de açúcares por cromatografia

líquida de alta eficiência, HPLC (Merck-Hitachi LaChrom L-7200 series, USA). Estas últimas análises também foram realizadas nos sobrenadantes das amostras colhidas a  $t = 0$  h, de forma a calcular-se o consumo de açúcares totais e as taxas de remoção de CQO,  $N - NH_3$ ,  $NTK$  e  $P$ .

### 3.3. Monitorização dos Crescimentos

#### 3.3.1. Observação Microscópica

As culturas foram observadas ao microscópio óptico (Olympus Bx60, Japão), de 48 em 48 h, com as objectivas de ampliação 40x e 100x (lente de emersão), de forma a acompanhar a evolução da cultura e controlar o aparecimento de possíveis contaminações.

#### 3.3.2. Densidade Óptica e pH

As leituras de densidade óptica ( $DO$ ) foram feitas em duplicado, 1 a 2 vezes por dia, contra água destilada, com 1000  $\mu L$  de amostra na *cuvette*, e de forma a que os valores estivessem incluídos na gama 0,3 – 0,8, diluindo sempre que necessário. Antes de qualquer leitura, a *cuvette* era convenientemente lavada com água destilada e as amostras devidamente agitadas, com uso do vórtex (MS2 Minishaker, IKA, Alemanha), para correcta homogeneização e a fim de desintegrar possíveis agregados celulares. A  $DO$  foi lida a 540  $nm$  para *S. obliquus* e a 600  $nm$  para *R. toruloides* e culturas mistas (espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 20, Portugal). Para cada ensaio, foram traçadas as curvas de crescimento, de absorvância em função do tempo de incubação.

As leituras de pH (potenciómetro Consor C3021, Bélgica) foram também feitas em duplicado e 1 a 2 vezes por dia.

Após a representação das curvas de crescimento, determinaram-se as correspondentes taxas específicas de crescimento,  $\mu$  ( $tempo^{-1}$ ), através da Eq.3.1, que expressa o balanço mássico à biomassa para uma cultura operada em modo descontínuo (Eq.2.7). Ao longo do trabalho foram apresentadas e discutidas as  $\mu$  correspondentes à fase exponencial de cada crescimento, ou seja, apenas referente ao período de maior crescimento (que não foram chamadas de  $\mu_{máx}$  pela elevada limitação e inibição verificadas nas condições deste trabalho). Os valores do parâmetro  $X$ , correspondente à concentração de biomassa no tempo  $t$ , podem ser absorvâncias (adimensional), concentração mássica ( $g/l$ ) ou número de células (Hu et al., 2012).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \leftrightarrow \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \int_0^t \mu \cdot dt \leftrightarrow \ln(X) = \mu \cdot t + \ln(X_0) \quad (Eq. 3.1)$$

O tempo de duplicação da cultura ( $t_d$ ) é calculado pela Eq. 3.2 (Hu et al., 2012).

$$t_d = \ln(2) / \mu \quad (Eq. 3.2)$$

A produtividade máxima volumétrica de biomassa,  $P_{X_{máx}}$   $g/(L \cdot d)$ , é calculada pela Eq. 3.3 (Hu et al., 2012), com o parâmetro  $X$  expresso em  $g/L$  e o parâmetro  $t$  em *dias*.

$$P_{X_{m\acute{a}x}} = \frac{(X_t - X_0)}{t - t_0} \quad (Eq. 3.3)$$

Em que  $X_t$  é a concentração máxima de biomassa ( $X_{m\acute{a}x}$ ), atingida ao instante  $t$ , e  $X_0$  é a concentração de biomassa logo após a inoculação da cultura ( $t_0$ ).

### 3.4. Citometria de Fluxo

A viabilidade celular e a actividade enzimática das culturas dos ensaios realizados neste trabalho, foram avaliadas por citometria de fluxo (CF), (FACSCalibur Flow Cytometer, Becton-Dickinson biosciences, CA, USA), tendo sido os citogramas analisados pelo software *CellQuestPro* e pelo programa *Flowing Software*.

As amostras foram previamente sonicadas (Transsonic T 660/H, Elma, Alemanha) durante 10 s, de forma a destruir possíveis agregados celulares, mas sem interferir com a integridade celular. Para os ensaios de culturas puras de microalgas, as amostras foram diluídas em tampão (PBS ou McIlvain) de forma a analisarem-se 400 *eventos* · s<sup>-1</sup> no citómetro e, para os ensaios de culturas puras de levedura e de culturas mistas de microalga e levedura, as amostras foram diluídas em tampão de forma a analisarem-se 1000 *eventos* · s<sup>-1</sup> (Freitas et al., 2014). Os tampões foram filtrados com membranas de filtração de 0,22 µm (Syringe-Filter, TPP Techno Plastic Products AG, Suíça).

#### 3.4.1. Integridade da Membrana

A integridade da membrana foi avaliada recorrendo ao corante SytoxGreen. As amostras foram diluídas com solução salina tampão de fosfato (PBS) de forma a obter-se o número de eventos por segundo pré-definido, como acima indicado, e incubadas no escuro com 5 µl de SytoxGreen 30 µM, durante 25 min. O SytoxGreen 30 µM foi obtido por diluição do corante SytoxGreen 5 mM (invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA) em dimetilsulfóxido (DMSO). O tampão PBS usado, foi preparado a partir de pastilhas comerciais (pH 7,4; VWR International, LLC, Ohio, Estados Unidos da America).

A fluorescência do SytoxGreen é detectada em FL1, quando excitado por radiação a 488 nm.

#### 3.4.2. Actividade Enzimática

A actividade enzimática foi analisada recorrendo ao corante CFDA, sendo que para o efeito, e à semelhança do que foi feito para a análise com SytoxGreen, as amostras têm de ser previamente diluídas de forma a obter-se o número de eventos por segundo pré-estabelecido. Neste caso, a diluição é feita com solução tampão McIlvaine e as amostras diluídas são incubadas com 20 µL de CFDA 10 mg/mL durante 50 min. O tampão McIlvaine é preparado juntando volumes iguais de ácido cítrico 100 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM, sendo o pH ajustado a 4,0 e levado à autoclave a esterilizar (Freitas et al., 2014). A preparação da solução de CFDA 10 mg/mL é feita por diluição de 10 mg de CFDA (Molecular Probes, Carlsbad, USA) em 1 mL de acetona (Freitas et al., 2014).

À semelhança do SytoxGreen, também a fluorescência da CFDA é detectada em FL1 quando excitada com radiação a 488 nm (Freitas et al., 2014), o que inviabiliza a análise citométrica da amostra corada em simultâneo com os dois corantes.

### 3.4.3. Clorofila

A clorofila, característica das células vegetais, pode ser monitorizada por CF, uma vez que é detectada em FL3. Isto permite distinguir e seleccionar a população das microalgas dos restantes eventos analisados pelo citómetro.

## 3.5. Contagem de Células

### 3.5.1. Câmara de Neubauer ou Hemocitómetro

A câmara de Neubauer, Figura 3.5(a), é uma lâmina de microscopia mais alta que uma lâmina normal e com marcações em quadrantes de várias medidas conhecidas (Figura 3.5(b)) (Perez, 2006).

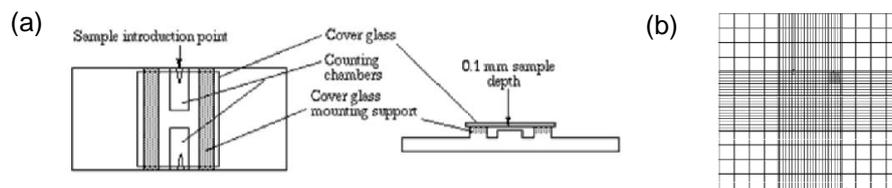


Figura 3.5: a) Câmara de Neubauer ou hemocitómetro, com representação da câmara de contagem e da lamela de vidro e respectivo suporte. b) Representação das marcações em quadrículas da câmara de contagem (Perez, 2006).

A escolha do quadrante onde se faz a contagem é baseada na dimensão do microrganismo em questão. No total a câmara tem 9 quadrantes, cada um com  $1 \times 1 \text{ mm}$ . Ao ser colocada a lamela, a distância desta até à lâmina (profundidade) é de  $0,1 \text{ mm}$ , o que faz com que cada quadrante suporte um volume de suspensão celular de  $0,1 \text{ mm}^3$ . O número de quadrículas a que corresponde este volume é dependente do quadrante em causa e, como tal, para saber o volume de suspensão celular em cada quadrícula, divide-se o volume total do quadrante pelo correspondente número de quadrículas. Após contagem celular, a densidade celular é determinada pela Eq. 3.4 (BTI, 2015).

$$\text{Densidade Celular} \left( \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Média } N^{\circ} \text{ de Células por Quadrícula} \times \text{Factor diluição}}{\text{Volume de uma quadrícula}} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

Este método de contagem foi usado para os ensaios com culturas puras de *S. obliquus* devido às baixas densidades celulares características das suspensões de microalgas. Este facto, acrescido às elevadas dimensões celulares da microalga, determinou que se optasse por fazer a contagem nos quadrantes de maiores dimensões. Foi sempre feita a contagem de 16 quadrículas e a correspondente média, de forma a determinar a densidade celular pela Eq. 3.4.

Os ensaios com *R. toruloides* apresentavam densidades celulares muito elevadas, devido às altas taxas de crescimento destes microrganismos, o que dificultou a contagem celular diária por este método. Para estes ensaios e para os ensaios com culturas mistas, a contagem celular foi feita com recurso à citometria de fluxo.

A contagem celular dos pré-inóculos foi feita por hemocitómetro, tanto para as culturas de *S. obliquus*, como de *R. toruloides* (para os pré-inóculos de *R. toruloides*, a contagem foi feita pelo quadrante com as quadrículas menores, quadrante central).

### 3.5.2. Citometria de Fluxo

Tal como já foi referido, foram realizados ensaios em branco para cada condição estudada (contendo o mesmo meio de cultura, incubados nas mesmas condições e durante o mesmo tempo, mas sem inóculo), que foram utilizados para contagem de células por citometria, do seguinte modo: acertou-se a diluição da amostra com o tampão (PBS), afim de se obter aproximadamente  $1000 \text{ eventos} \cdot \text{s}^{-1}$  e registou-se o valor; posteriormente, utilizou-se a mesma diluição para o ensaio em branco correspondente, analisando-se as soluções no citómetro e registou-se o número de eventos por segundo. Considerou-se que o branco continha o mesmo número de eventos que as amostras, com excepção das células. Logo, por subtracção do número de eventos/s registados na amostra e no branco, obtém-se o número aproximado de células/s nas amostras (Eq. 3.5).

$$\frac{N^{\circ} \text{ Total de Células}}{s} = \left( \frac{N^{\circ} \text{ Total de Eventos}}{s} \right)_{\text{Amostra}} - \left( \frac{N^{\circ} \text{ Total de Eventos}}{s} \right)_{\text{Branco}} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

Através do número de células/s, foi possível obter informação aproximada sobre a evolução da proporção de cada população ao longo do tempo dos ensaios. Dividindo o número de células/s pelo caudal de aspiração do citómetro de fluxo ( $\text{mL/s}$ ), pode determinar-se a concentração celular.

Este método foi usado para os ensaios de culturas puras de *R. toruloides* e de culturas mistas. No entanto, para os ensaios com culturas mistas foi necessário acrescentar um passo ao protocolo, relativo à diferenciação entre as populações das células de *S. obliquus* e *R. toruloides*. Para estes casos, foram identificadas duas regiões correspondentes às duas populações dos dois microrganismos, cuja distinção se baseou na diferença de dimensões e complexidade interna entre os dois microrganismos. O citómetro de fluxo fornece informação sobre o número total de eventos analisados, em cada uma das duas regiões, o que permite determinar a percentagem de células de *S. obliquus* e *R. toruloides* (Eq. 3.6) e, conseqüentemente, os correspondentes valores em número de células/s (Eq. 3.7 e Eq. 3.8). As análises foram sempre feitas em duplicado.

$$\% \text{Células } R. \text{ toruloides} = \frac{N^{\circ} \text{ Eventos } R_i}{N^{\circ} \text{ Eventos } R_i + N^{\circ} \text{ Eventos } R_j} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.6})$$

$$R. \text{ toruloides} \left( \frac{\text{Células}}{s} \right) = \frac{\% \text{Células } R. \text{ toruloides}}{100} \times \frac{N^{\circ} \text{ Total de Células}}{s} \quad (\text{Eq. 3.7})$$

$$S. \text{ obliquus} \left( \frac{\text{Células}}{s} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ Total de Células}}{s} - R. \text{ toruloides} \left( \frac{\text{Células}}{s} \right) \quad (\text{Eq. 3.8})$$

$R_i$  representa a região relativa à população de *R. toruloides*;  $R_j$  representa a região relativa à população de *S. obliquus*.

### 3.6. Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO)

O procedimento usado na determinação de CQO (Horwitz & Latimer, 2005) é baseado na oxidação da matéria orgânica pelo dicromato de potássio, na presença de ácido sulfúrico e iões de prata como catalisador. A medição é feita pela quantificação do dicromato que não reage, por titulação com uma solução de ferro (II).

### 3.6.1. Reagentes

Solução de Digestão de Dicromato de Potássio (Solução A): Secar 10,216 g de  $K_2Cr_2O_7$ , a 103°C e durante 2 h; adicionar ao  $K_2Cr_2O_7$  seco 167 mL de  $H_2SO_4$  concentrado; colocar em agitação magnética; adicionar 33,3 g de  $MgSO_4$ ; prefazer o volume de 1 L com água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv).

Solução  $H_2SO_4$  com  $AgSO_4$  (Solução B): Dissolver 10,12 g de  $AgSO_4$  em ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado; prefazer o volume de 1 L com  $H_2SO_4$  concentrado.

Solução de Sulfato de Ferro (II) Amoniacal 0,0125 M (Solução D): Dissolver 49,01 g de  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  em cerca de 500 mL de água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv); adicionar aproximadamente 20 mL de  $H_2SO_4$  concentrado; deixar arrefecer e prefazer o volume de 1 L com água destilada; Diluir 100 mL da solução preparada (0,125 M) em água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv), prefazendo o volume de 1 L.

Solução de Ferroína (Solução F): Solução comercial (0,025 mol/L; VWR International, LLC, Ohio, Estados Unidos da America).

Solução de lavagem Cromo-Sulfúrico (Solução G): Dissolver 20 g de  $K_2Cr_2O_7$  em 54 mL de  $H_2SO_4$ , num copo, em agitação e adicionando lentamente; prefazer o volume de 1 L com água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv).

Solução de Lavagem de  $H_2SO_4$  (Solução H): Colocar 20 mL de  $H_2SO_4$  concentrado num balão volumétrico de 100 mL e prefazer o volume com água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv).

### 3.6.2. Procedimento

Colocou-se em cada tudo de digestão (HACH COD REACTOR): 1,5 mL de amostra (diluída, se necessário), 1 mL de solução A e 2 mL de solução B. Tapou-se devidamente os tubos, misturou-se vigorosamente e levou-se ao digestor a  $150 \pm 2^\circ C$  durante 2 h. Após as 2 h de digestão, as amostras foram retiradas e deixadas a arrefecer até que se encontrassem à temperatura da sala, para que o conteúdo dos tubos fosse então transferido para Erlenmeyers de 50 mL. Lavou-se os tubos com água destilada e colocou-se a água de lavagem também para dentro dos Erlenmeyers. Adicionou-se 1 a 2 gotas de solução F e titulou-se com a solução D, sendo o fim da titulação registado pela passagem da cor da solução de azul pálido para laranja/vermelho. Para lavagem dos tubos: adicionou-se um pequeno volume de solução G e deixou-se ficar durante aproximadamente 1 h; lavou-se com solução H, com auxílio de uma pipeta; e por fim lavou-se com água destilada.

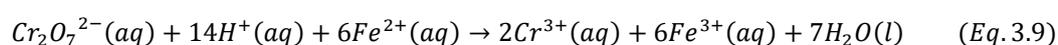
Casos em que a solução de titulado, antes da adição do indicador (solução F), era esverdeada, eram indicativos da incorreta diluição da amostra e que, conseqüentemente, a titulação não era possível (o ponto de viragem ocorre imediatamente com a adição do indicador). Nestes casos aumentou-se a diluição.

As análises de CQO foram feitas em duplicado e por cada digestão foi feito um branco. Para o branco o procedimento foi em tudo igual ao descrito, substituindo-se a amostra por água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv).

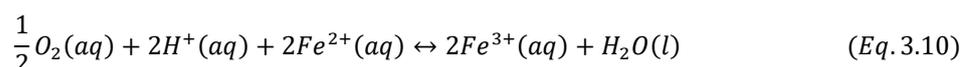
As diluições feitas dependeram da concentração de açúcar da amostra: apenas efluente (1:1); 5 g/l (1:50); 10 g/L e 15 g/L (1:100); 20 g/L (1:150); 40 g/L (1:300); 60 g/L (1:450); 80 g/L (1:600) e 100 g/L (1:750).

### 3.6.3. Cálculos

A reacção que ocorre durante a titulação é a apresentada na Eq.3.9, em que  $A$  e  $B$  são, respectivamente, o volume de titulante (solução D), em ml, gasto na titulação do branco e da amostra.  $M$  é a molaridade do titulante.



E, portanto:  $(A - B)$  corresponde ao volume de titulante gasto na titulação do dicromato em excesso, e  $(A - B) \times M$  corresponde ao número de moles de  $Fe(II)$  consumido. Sendo a relação entre o número de moles de  $Fe(II)$  consumido e o oxigénio dissolvido, dada pela Eq. 3.10.



O número de moles de  $O_2$  necessárias à oxidação do  $Fe(II)$  a  $Fe(III)$ , é dado pela Eq. 3.11. Como os valores de CQO são expressos em  $mgO_2/L$ , começa-se por fazer a conversão de  $mol$  para  $mgO_2$  pela Eq. 3.12, e determina-se então, pela Eq. 3.13, o valor de CQO, em que  $V_S$  é o volume de amostra.

$$mol = (A - B) \times \frac{M}{4} \quad (Eq. 3.11)$$

$$mgO_2 = (A - B) \times \frac{M}{4} \times 32000 \quad (Eq. 3.12)$$

$$mgO_2/L = (A - B) \times \frac{M}{V_S} \times 8000 \quad (Eq. 3.13)$$

## 3.7. Determinação de Nitrogénio

Neste trabalho foram feitas análises do nitrogénio total (orgânico e amoniacal) e apenas do nitrogénio amoniacal. Para o efeito, e entre outros equipamentos, recorreu-se a um eléctrodo selectivo à amónia (Multimeter MM 41, CRISON INSTRUMENTS, S.A., Espanha).

### 3.7.1. Calibração do Eléctrodo Selectivo de Amónia

A calibração do equipamento com eléctrodo selectivo de amónia (Multimeter MM 41, CRISON INSTRUMENTS, S.A., Espanha), necessário às análises de nitrogénio total e amoniacal, foi essencial e realizada a partir de uma solução padrão "mãe" de  $NH_4Cl$  1 g/L feita em laboratório. Foi também necessária uma solução de ajuste de força iónica, ISA,  $MgSO_4$  1M.

### 3.7.1.1. Reagentes

Solução-mãe de amónia ( $1 \text{ g/L NH}_4^+$ ): reagente analítico  $\text{NH}_4\text{Cl}$  seco durante 2 h a  $120^\circ\text{C}$ ;  $2,965 \text{ g}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  seco dissolvido em água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv), prefazendo o volume de  $1000 \text{ mL}$ .

Soluções de diferentes concentrações preparadas a partir da solução-mãe ( $1 \text{ g/L NH}_4^+$ ), de forma a estabelecer as curvas de calibração.

Solução ajustadora de força iónica, ISA,  $\text{MgSO}_4 \text{ 1M}$ :  $24,67 \text{ g}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dissolvidos em água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv), prefazendo o volume de  $100 \text{ mL}$ .

### 3.7.1.2. Procedimento

Seleccionou-se o Canal 2 – ISE MEASURE (amónio); seleccionaram-se as curvas 1 ( $0 - 5 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$ ), 2 ( $5 - 50 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$ ) ou 3 ( $100 - 1000 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$ ), correspondentes às diferentes gamas de concentração; carregou-se em *Start Calibration* e calibrou-se por ordem crescente de concentração. Para efectuar a leitura, colocou-se num copo de plástico de  $50 \text{ mL}$ ,  $10 \text{ mL}$  de amostra e  $1 \text{ mL}$  de solução ISA; colocou-se um agitador magnético; lavou-se bem o eléctrodo com água destilada e secou-se cuidadosamente com papel absorvente, sempre com cuidado para não riscar a membrana; mergulhou-se o eléctrodo na solução e seleccionou-se *Start measurement ISE*, de forma a fazer a leitura.

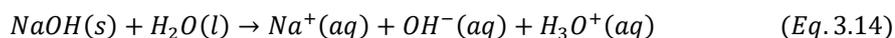
Foram assim traçadas as 3 curvas de calibração: curva 1, curva 2 e curva 3.

## 3.7.2. Determinação do Nitrogénio Total de Kjeldahl (NTK)

### 3.7.2.1. Reagentes

Solução de  $\text{CuSO}_4$  ( $10\% \text{ m/v}$ ):  $15,642 \text{ g}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dissolvido em  $100 \text{ mL}$  de água destilada.

Solução de  $\text{NaOH}$  ( $40\% \text{ m/v}$ ):  $40 \text{ g}$  de  $\text{NaOH}$  sólido dissolvido em  $100 \text{ mL}$  de água destilada. A reacção (Eq. 3.14) é altamente exotérmica e, portanto, a dissolução foi feita em agitação e num copo com gelo.

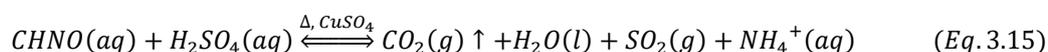


Solução ajustador de força iónica, ISA,  $\text{MgSO}_4 \text{ 1M}$ .

### 3.7.2.2. Procedimento

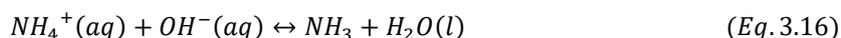
Para determinação do NTK foi utilizado um procedimento recolhido do Grupo Solvay, anunciado de seguida.

Transferiu-se, com o auxílio de uma pipeta volumétrica de  $25 \text{ mL}$ ,  $25 \text{ mL}$  da amostra para um balão de Kjeldahl (DURAN Flasks, Kjeldahl  $500 \text{ mL}$ ), colocado num suporte metálico apropriado. Adicionou-se  $3 \text{ mL}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e  $3 \text{ mL}$  de solução de  $\text{CuSO}_4$  ( $10\% \text{ m/v}$ ). Colocou-se na hotte em camisa de aquecimento a  $120 - 130^\circ\text{C}$ , durante 1 h. Durante o aquecimento o N orgânico reagiu e converteu-se em  $\text{N} - \text{NH}_3$ , Eq. 3.15, ficando todo o N da amostra nesta forma.



Retirou-se os balões de Kjeldahl do aquecimento com auxílio de uma luva de resistência térmica, colocou-se no suporte metálico e esperou-se até arrefecer. Casos em que a amostra apresentasse coloração amarelada após o aquecimento, adicionou-se 4 mL de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$  (30%)) e retornou-se ao aquecimento até à libertação de fumos brancos; se ainda assim permanecesse amarela, colocou-se mais 1 – 2 mL de  $H_2O_2$  (30%) e retornou-se ao aquecimento.

Após arrefecimento, adicionou-se aproximadamente 100 mL de água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv) ao balão de Kjeldahl e homogeneizou-se. Transferiu-se o conteúdo do balão de Kjeldahl para um balão volumétrico de 200 mL. Lavou-se o balão de Kjeldahl com água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv) e foi-se transferindo as águas de lavagem para o balão volumétrico de 200 mL. No final, perpez-se os 200 mL e homogeneizou-se. Transferiu-se, com auxílio de uma pipeta volumétrica de 10 mL, 10 mL da solução para um copo e adicionou-se 15 mL de água destilada (ultra-pure water, interlab, PURIST uv). Adicionou-se ao copo 2 mL da solução de NaOH (40% m/v). Aguardou-se 8-10 min para estabilização, Eq. 3.16, e fez-se a leitura com o eléctrodo específico de amónia sob agitação (Multimeter MM 41, CRISON INSTRUMENTS, S.A., Espanha). Para fazer a leitura: colocou-se num copo de plástico de 50 mL os 25 mL de amostra; colocou-se um agitador magnético; seleccionou-se o Canal 2 – ISE MEASURE (amónio) e a curva de concentrações mais adequada; lavou-se bem o eléctrodo com água destilada e secou-se cuidadosamente com papel absorvente; mergulhou-se o eléctrodo na solução e fez-se a leitura.



Todas as medições foram realizadas nas mesmas condições de agitação (velocidade igual, barras de agitação similares e distância idêntica entre o eléctrodo e a barra de agitação).

Para as análises feitas neste trabalho fez-se uma alteração no procedimento: o tempo de aquecimento foi aumentado para 3 h, até ao fim da libertação de fumos brancos. Isto foi necessário apenas para as amostras suplementadas com melaço, uma vez que para as amostras só com efluente (não suplementadas), 1 h de aquecimento foi suficiente. As análises foram sempre feitas em duplicado.

### 3.7.2.3. Cálculos

$$NTK_{Amostra} \left( \frac{mgNH_4^+}{L} \right) = Valor\ dado\ pelo\ eléctrodo \left( \frac{mgNH_4^+}{L} \right) \times factor\ diluição \quad (Eq. 3.17)$$

$$factor\ de\ diluição = \frac{1}{\frac{25}{200} \times \frac{10}{25+2}} \cong 21,6 \quad (Eq. 3.18)$$

## 3.7.3. Determinação do Nitrogénio Amoniaco ( $N - NH_3$ )

### 3.7.3.1. Reagentes

Solução ajustadora de força iónica, ISA,  $MgSO_4$  1M.

### 3.7.3.2. Procedimento

Para análise do  $N - NH_3$  recorreu-se ao equipamento com eléctrodo selectivo à amónia, CRISON-Multimeter MM 41. As medições foram realizadas em duplicado e nas mesmas condições de agitação (velocidade igual, barras de agitação similares e distância idêntica entre o eléctrodo e a barra de agitação).

Colocou-se num copo de plástico de 50 mL, 10 mL de amostra e 1 mL de solução ISA e um agitador magnético. Selecionou-se o Canal 2 – ISE MEASURE (amónia) e a curva de concentrações mais adequada. Lavou-se bem o eléctrodo com água destilada e secou-se cuidadosamente com papel absorvente. Mergulhou-se o eléctrodo na solução e fez-se a leitura.

### 3.8. Determinação do Fósforo

Para determinação do fósforo foi usado um kit comercial (PhosVer 3 Phosphate Reagent, HACH), que permite quantificar (em mg/L):  $PO_4^{3-}$  (fosfatos),  $P - PO_4^{3-}$  (fósforo presente nos fosfatos) e  $P_2O_5$  (pentóxido de fósforo). O kit contém: molibdato de sódio (7631-95-0) e potássio dissulfato (7790-62-7). Por este método a quantificação foi realizada por espectrofotometria (Spectrophotometer HACH DR/2010).

Para fazer a análise, transferiu-se 25 mL de amostra para um frasco apropriado (específico para o equipamento) que foi colocado no espectrofotómetro como branco. Adicionou-se uma bolsa do kit comercial, agitou-se vigorosamente e deixou-se em repouso/espera durante 2 min. Ao fim dos 2 min fez-se a leitura. Uma vez que as amostras deste trabalho apresentavam elevadas concentrações de  $P$ , foi necessário diluí-las, de forma a estarem dentro das curvas de calibração do aparelho (que converte absorvâncias em concentrações mássicas). As leituras não puderam ser feitas em duplicado em consequência do elevado custo do kit comercial e do elevado número de amostras.

### 3.9. Eficiências de Remoção de Nutrientes do Efluentes

A partir dos valores obtidos das análises de CQO,  $N$  e  $P$ , para os pontos inicial e final de cada ensaio, determinaram-se as eficiências de remoção ( $ER$ ) dos nutrientes do efluente, como forma de se avaliar a eficiência do tratamento aplicado ao efluente estudado. Utilizou-se a Eq. 3.19, em que  $C_0$  e  $C_f$  são as concentrações inicial e final, respectivamente.

$$ER (\%) = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100 \quad (Eq. 3.19)$$

### 3.10. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos da biomassa colhida no final de cada ensaio foram determinados por cromatografia gás-líquido. Depois de liofilizada, a biomassa foi sujeita a uma reacção de transesterificação (Figura 2.8), de forma a converter os lípidos saponificáveis intracelulares em esteres metílicos dos ácidos gordos, sendo estes quantificáveis por cromatografia gás-líquido.

### 3.10.1. Procedimento

A amostra liofilizada foi transferida para um almofariz e moída até ficar em pó, a fim de facilitar as trocas mássicas durante a reacção de transesterificação. Para cada amostra pesou-se, em duplicado, cerca de 100 mg da biomassa liofilizada, dentro dos tubos de reacção, previamente cheios com gás inerte (N) de forma a evitar a oxidação dos lípidos da biomassa. Adicionaram-se 2 mL de solução metanol/cloreto de acetil (95: 5, v/v) (solução feita em gelo e com adição gota a gota) e 0,2 mL de ácido heptadecanóico (5 mg/mL, Nu-Check-Prep, Elysian, USA), C17:0, como padrão interno. Os tubos foram revestidos com papel de alumínio, de forma a proteger as amostras da luz, e colocados em aquecimento, a 80°C durante 1 h, para que ocorresse a reacção de transesterificação (Figura 2.8). Após um passo de arrefecimento, adicionou-se a cada tubo 1 mL de água (ultra-pure water, interlab, PURIST uv) e 2 mL de n-hexano. Nas amostras em que a separação entre as fases aquosa e orgânica não ocorreu espontaneamente, adicionou-se 1 mL de n-hexano. A fase orgânica, com os ésteres metílicos, foi finalmente extraída, filtrada por um leito de sulfato de sódio anidro, e analisada por cromatografia gás-líquido.

Os ésteres metílicos foram analisados num cromatógrafo gás-líquido GC BRUCKER SCION 436-SC (Billerica, Massachusetts, EUA), equipado com um detector de ionização de chama. A separação dos compostos foi feita numa coluna capilar de sílica com 0,32 mm × 30 mm (filme de 0,32 μm) Supelcowax 10 (Supelco, Bellafonte, Palo Alto, CA, USA), que opera com hélio como gás de arrasto, com um caudal de 3,5 mL/min, e a uma pressão de 13,5 psi. A coluna está programada para uma temperatura inicial de 200°C, durante 8 min, e depois aumentada 4°C/min até aos 240°C, temperatura à qual operou durante 16 min. O injector e o detector estão, respectivamente, a 250°C e 280°C, e a uma proporção de 1:20 durante 5 min e 1:10 no restante tempo de corrida.

A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de misturas de ésteres metílicos (Nu-Check-Prep, Minesota, EUA).

### 3.10.2. Cálculos

Da análise no cromatógrafo gás-líquido, resulta um cromatograma, no qual a área de cada pico é proporcional à massa/concentração de uma molécula específica. Com base nos tempos de retenção é possível fazer corresponder a cada pico um éster metílico específico, e por comparação da área de cada pico com a área do pico correspondente ao padrão interno (cuja massa na amostra é conhecida) é possível determinar a massa na amostra de cada éster metílico identificado (Eq. 3.20).

$$\frac{A_{PI}}{A_i} = f_{r_i} \times \frac{m_{PI}}{m_i} \quad (Eq. 3.20)$$

Em que  $f_{r_i}$  é o factor resposta do éster metílico  $i$ ,  $A_{PI}$  é a área do pico do padrão interno,  $A_i$  é a área do pico do éster metílico  $i$ ,  $m_{PI}$  a massa do padrão interno adicionada à amostra, e  $m_i$  é a massa do éster metílico  $i$ . O  $f_{r_i}$  foi calculado através do declive da recta dada pela Eq. 3.21, obtida através da análise de um conjunto de amostras com massa do éster metílico  $i$  conhecida. Por definição, o  $f_r$  do

padrão interno é considerado 1. Sabe-se que, por amostra, é adicionado 0,2 mL de ácido heptadecanóico (5 mg/mL), ou seja:  $m(C17:0) = 1 \text{ mg/amostra}$ . Assim, da Eq. 3.21 vem que:

$$m_i(\text{mg}) = \frac{A_{\text{Pico } i}}{A_{\text{Pico } C17:0}} \times f_{r_i} \quad (\text{Eq. 3.21})$$

A massa total de ácidos gordos na amostra, é dada pela soma das massas dos vários ésteres metílicos, Eq. 3.22.

$$m_{AG}(\text{mg}) = \sum m_{\text{Éster Metílico}_i}(\text{mg}) \quad (\text{Eq. 3.22})$$

O teor (mg/mg peso seco) de cada um dos ésteres metílicos identificados, correspondentes às massas dos respectivos ácidos gordos, é calculado com os valores da toma inicial da amostra (peso seco).

### 3.11. Quantificação da Sacarose, Frutose e Glucose por HPLC

A quantificação dos principais açúcares presentes nas amostras em estudo (efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar, contendo sacarose, frutose e glucose) foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (LaChrom Merck/Hitachi, Alemanha), utilizando um detector diferencial de índice de refração (IR). A análise foi realizada utilizando uma coluna Waters SugarPak 1 (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA), que permite a quantificação simultânea dos três açúcares, estando enunciadas, na Tabela 3.1, as características da coluna e as condições operacionais.

Tabela 3.1: Principais características da coluna Waters SugarPak 1 e condições operacionais.

Características	Coluna Sugar-Pak
Dimensões	6,5 × 300 mm
Fase Móvel	Ca-EDTA, 50 mg/L
Caudal Fase Móvel	0,5 ml/min
Temperatura da Coluna	75°C
Temperatura Detector RI	30°C
Tempo de Corrida	20 min

Antes da análise HPLC, as amostras foram centrifugadas (BECKMAN COULTER TM 18 Microfuge) em eppendorfs de 1,5 mL, a 10 000 rpm durante 10 min, para remoção de eventuais partículas ou de biomassa residual. O sobrenadante foi recuperado, colocado em *vials* e analisado.

Por cada análise foram corridos padrões de sacarose, frutose e glucose de concentrações conhecidas (1 g/L, 5 g/L, 10 g/L e 25 g/L), de forma a estabelecer, com base nas áreas dos picos obtidas por integração dos respectivos cromatogramas, as correspondentes curvas de calibração. Por integração dos cromatogramas das amostras e com as curvas de calibração previamente estabelecidas, obtiveram-se as concentrações nos três açúcares. Amostras com concentrações de açúcares superiores a 25 g/L, foram devidamente diluídas.

Os cromatogramas foram analisados com o software Chromeleon™ SP6 build 783 (1994-2003, Dionex, Thermo Fischer Scientific Inc., USA).

## 4. Resultados e Discussão

Este trabalho iniciou-se com a realização de ensaios utilizando culturas puras dos microrganismos (*S. obliquus* e *R. toruloides*), em condições de esterilidade. De forma a verificar os requisitos nutricionais de cada microrganismo, as culturas puras foram desenvolvidas em meio contendo exclusivamente efluente e em efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar a diferentes concentrações, de forma a seleccionar a concentração óptima de açúcares totais que induzisse a máxima concentração de biomassa e de produtos lipídicos e, se possível, a máxima eficiência de remoção de contaminantes do efluente. De seguida, realizaram-se ensaios utilizando culturas mistas com ambos os microrganismos, em condições de assepsia, de forma a confirmar que os dois microrganismos crescem na presença um do outro e, uma vez mais, a fim de seleccionar a concentração óptima de açúcares totais a adicionar ao efluente. Por fim, e para a concentração óptima seleccionada, realizaram-se ensaios com culturas mistas em condições de esterilidade e de não esterilidade, para comparação, tendo em conta as diferenças de custos associados aos dois processos. Todos os ensaios foram concluídos quando as culturas atingiram a fase estacionária.

Todos os resultados obtidos neste trabalho, relativos aos vários crescimentos, estão resumidos nas Tabelas 4.7 e 4.8 (com os respectivos desvios padrão), Capítulo 4.9.

### 4.1. Caracterização do Efluente

Para o desenvolvimento deste projecto, foi usado efluente secundário fornecido pela SCC de Vila Franca de Xira de três colheitas diferentes (já sujeito a pré-tratamento, sedimentação primária e tratamento secundário por digestão anaeróbia), estando as suas caracterizações apresentada na Tabela 4.1. A diferença entre a composição dos efluentes está relacionada com a altura do ano em que a colheita é feita, em consequência das distintas qualidades de cerveja produzida ao longo do ano. O efluente III tem uma carga em contaminantes muito superior, o que muito provavelmente está associado a um incompleto tratamento na estação de tratamento da fábrica. O efluente foi armazenado em câmara de refrigeração a 10°C e foi caracterizado no momento da utilização.

Tabela 4.1: Caracterização dos 3 efluentes usados ao longo deste trabalho, em que: CQO-carência química de oxigénio; N-NH<sub>3</sub>-nitrogénio amoniacal; NTK-nitrogénio total de Kjeldahl; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-fosfatos; P-PO<sub>4</sub><sup>(3-)</sup>-fósforo presente em fosfatos; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-pentóxido de fósforo.

Efluente	CQO (gO <sub>2</sub> /L)	N-NH <sub>3</sub> (mgNH <sub>4</sub> /L)	NTK (gN/L)	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	P - PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg/L)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/L)	Açúcares (g/L)
I	0,44 ± 0,01	23,2 ± 0,0	3,17 ± 0,07	41,0	13,0	31,0	0,63 ± 0,01
II	0,15 ± 0,03	73,4 ± 0,0	Não analisado	45,8	15,0	34,3	0,13 ± 0,00
III	17,83 ± 0,05	208,4 ± 0,1	5,52 ± 0,00	52,0	17,0	39,0	12,40 ± 0,02

O efluente I foi usado no ensaio estéril de *S. obliquus* até 20 g/L de açúcares totais. O efluente II foi usado nos ensaios estéreis de *S. obliquus* até 60 g/L, de *R. toruloides* até 100 g/L e de cultura mista até 60 g/L. O efluente III foi usado nos ensaios estéril e não estéril com cultura mista suplementado com 10 g/L de açúcares totais.

## 4.2. Ensaios Preliminares de Citometria de Fluxo

De forma a seleccionar os corantes a utilizar nas análises de citometria de fluxo, durante os ensaios das culturas puras e mistas com efluente da indústria cervejeira, com e sem suplementação de melão de cana-de-açúcar, foram realizados testes preliminares nos quais se testaram vários corantes para optimização das condições de coloração. Este estudo foi realizado para a microalga *S. obliquus*, uma vez que esses testes já foram feitos para a levedura *R. toruloides* (Freitas et al., 2014a).

### 4.2.1. Escolha dos corantes para a microalga *S. obliquus*

#### 4.2.1.1. Avaliação da Actividade Enzimática

De forma a avaliar a eficiência da CFDA na detecção da actividade enzimática das células de *S. obliquus*, foram testadas três culturas da microalga em diferentes condições fisiológicas que induziram nas células diferentes níveis de actividade enzimática. Para tal, adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  de CFDA 10  $\text{mg/mL}$  a uma suspensão de células com 13 dias de crescimento em meio Bristol (designada por cultura com células novas), a uma suspensão de células com 5 meses de crescimento em efluente secundário (designada por cultura com células velhas) e a uma suspensão de células tratadas num banho-maria a 100°C durante 20 min (designada por cultura com células mortas), tendo sido incubadas à temperatura ambiente, durante 40 min, e na ausência de luz.

A CFDA é detectada em FL1 e os gráficos obtidos são os apresentados na Figura 4.1.

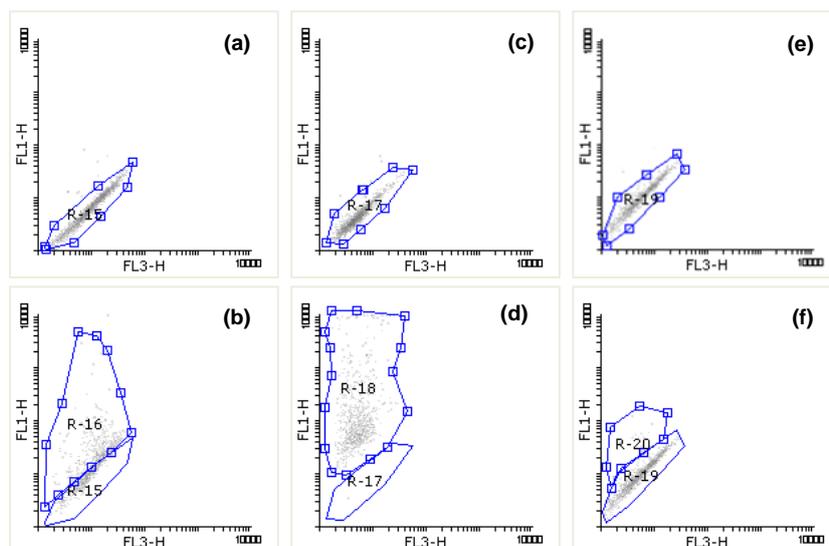


Figura 4.1: (a), (c) e (e) são os citogramas relativos às autofluorescências das células novas, velhas e mortas de *S. obliquus*, respectivamente. (b), (d) e (f) correspondem aos citogramas obtidos para as mesmas amostras, após os 20 min de incubação no escuro com 5  $\mu\text{L}$  de CFDA 10  $\text{mg/mL}$ . R15, R17 e R19 correspondem às populações de células não coradas; R16, R18 e R20 correspondem às populações de células coradas com a CFDA.

Através dos citogramas da Figura 4.1 pode verificar-se que o corante CFDA não corou as células mortas ( $\%Células_{R20} = 6,21$ ) e corou as células vivas ( $\%Células_{R16} = 54,3$  e  $\%Células_{R18} = 97,7$ , correspondente às células novas e velhas, respectivamente). Este resultado está de acordo com o esperado, uma vez que, ao contrário das células mortas, as células vivas têm actividade enzimática e, como tal, as esterases hidrolisam a CFDA formando o composto fluorescente detectado em FL1. Percebe-se também que as culturas das células velhas (provavelmente em fase estacionária)

apresentam uma proporção maior de células coradas com CFDA do que a cultura de células novas (provavelmente em fase exponencial), revelando a actividade enzimática de *S. obliquus* quando em crescimento no efluente.

Conclui-se, que a CFDA pode ser usada para avaliação da actividade enzimática de células de *S. obliquus*.

#### 4.2.1.2. Avaliação da Integridade Membranar

Inicialmente testou-se o corante IP, para avaliação da integridade membranar das células de *S. obliquus*, pelo facto de poder ser usado simultaneamente com a CFDA. A dupla coloração IP/CFDA permite avaliar o estado da célula, simultaneamente, em termos de actividade enzimática e integridade da membrana (Papadimitriou et al., 2006). Assim, de forma a verificar se o IP podia, ou não, ser utilizado com a CFDA (dupla coloração), incubaram-se, durante 40 min, no escuro, as três suspensões celulares já referidas (células novas com 13 d de crescimento em meio Bristol; células velhas em crescimento em efluente secundário há 5 meses; e células mortas tratadas em banho-maria durante 20 min) com 5  $\mu\text{L}$  de CFDA 10  $\text{mg}/\text{mL}$ ; após incubação, adicionou-se 2  $\mu\text{L}$  de IP 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , seguindo-se 1 min de incubação; e procedeu-se de seguida à análise das amostras no citómetro de fluxo. Constatou-se que, no caso das células de *S. obliquus*, a fluorescência do IP apresentou um sinal mais forte em FL2, sendo praticamente inexistente em FL3. A dupla coloração das células com IP/CFDA (Figura 4.2) mostra a distribuição de uma população em posição diagonal, o que significa que a fluorescência do IP é lida em FL2, e a fluorescência da CFDA é lida em FL1, não sendo assim possível o método da dupla coloração IP/CFDA com células de *S. obliquus*.

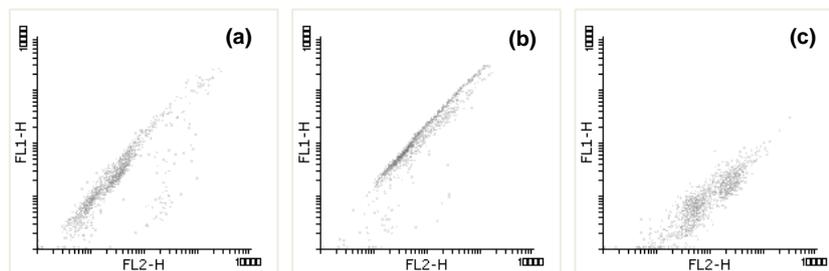


Figura 4.2: Citogramas obtidos por coloração simultânea com CFDA e IP, das células de *S. obliquus* (a) novas, (b) velhas e (c) mortas.

De seguida, foram testados individualmente dois corantes de detecção da integridade da membrana das células de *S. obliquus*: o IP e o SytoxGreen. A cada uma das três amostras de *S. obliquus* acima referidas (células novas, velhas e mortas) adicionou-se 2  $\mu\text{L}$  de uma solução de IP 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , sendo de seguida incubadas durante 1 min no escuro. Os citogramas obtidos após a corrida das amostras no citómetro de fluxo, estão apresentados na Figura 4.3. Para avaliação da coloração das células de *S. obliquus* com o corante SytoxGreen, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ , a cada uma das três amostras de células, seguindo-se 1 min de incubação no escuro, procedendo-se de seguida à corrida das amostras no citómetro de fluxo. Os citogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.4.

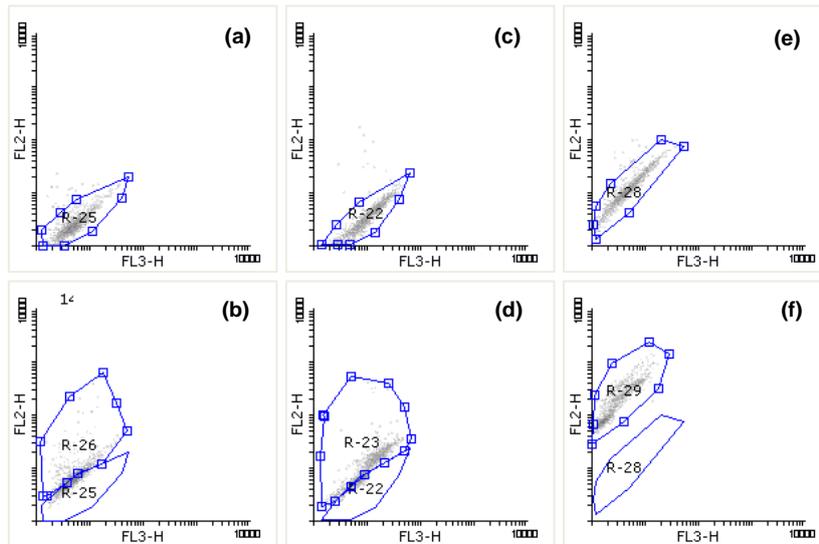


Figura 4.3: (a), (c) e (e) correspondem aos citogramas das autofluorescências das células novas, velhas e mortas de *S. obliquus*, respectivamente, ressuspensas em tampão PBS. (b), (d) e (f) correspondem aos citogramas das amostras coradas com 2  $\mu\text{L}$  de IP 1 mg/mL. R22, R25 e R28 correspondem às populações de células não coradas; R23, R26 e R29 correspondem às populações de células coradas com IP.

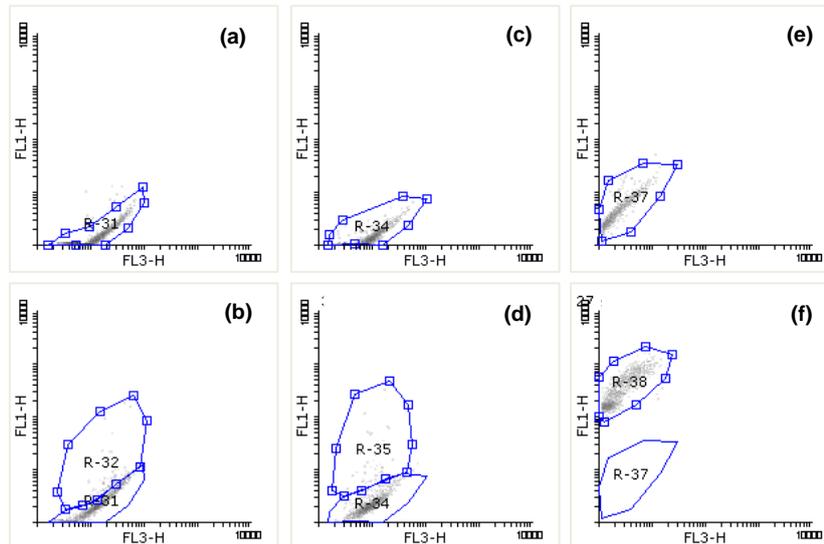


Figura 4.4: (a), (c) e (e) correspondem aos citogramas das autofluorescências das células novas, velhas e mortas de *S. obliquus*, respectivamente, ressuspensas em tampão PBS. (b), (d) e (f) correspondem aos citogramas das amostras coradas com 5  $\mu\text{L}$  de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ . R31, R34 e R37 correspondem às populações de células não coradas; R32, R35 e R38 correspondem às populações de células coradas com SytoxGreen.

Da análise dos citogramas da Figura 4.3 observou-se que, tal como se esperava, a proporção das células marcadas com IP (região R26, R23 e R29, respectivamente para as culturas novas, velhas e mortas) aumentou da cultura de células novas de *S. obliquus* (42,4%, Figura 4.3(b)) para a cultura de células velhas de *S. obliquus* (72,2%, Figura 4.3(d)), tendo sido máxima para a amostra de células de *S. obliquus* mortas (99,3%, Figura 4.3(f)). Estes resultados confirmam que a integridade da membrana da microalga foi afectada com a idade das culturas e com o tratamento térmico, tendo esta última condição destruído a membrana de praticamente todas as células de *S. obliquus*, uma vez que praticamente todas elas foram coradas pelo IP.

A coloração das três culturas de células de *S. obliquus* (novas, R32(12,9%); velhas, R35(12,2%); e mortas, R38(98,4%) com o corante SytoxGreen (Figura 4.4) revelou os mesmos resultados que o IP.

Uma vez que tanto o IP como o SytoxGreen coram células mortas de *S. obliquus*, incubou-se uma suspensão celular contendo uma mistura de células novas e células mortas na mesma proporção, com cada um dos corantes, de forma a perceber qual dos dois permitia uma melhor diferenciação entre células vivas e mortas. Aproveitou-se ainda para perceber, para cada um dos corantes, se essa separação de populações era mais nítida em FL1 ou em FL2. Os citogramas obtidos estão apresentados na Figura 4.5 (e na Tabela apresentada em Anexo II).

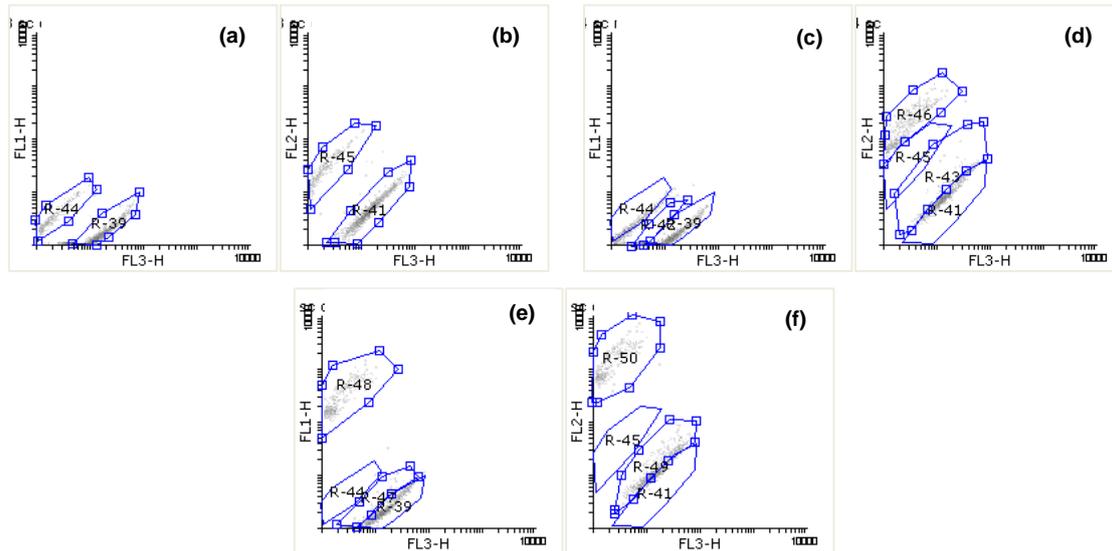


Figura 4.5: Citogramas correspondentes à análise de uma cultura com mistura de células novas e mortas de *S. obliquus*. (a) e (b) correspondem à autofluorescência da amostra em tampão PBS; (c) e (d) são o resultado da adição de  $2 \mu\text{L}$  de IP  $1 \text{ mg/mL}$  à amostra; e (e) e (f) são o resultado da adição de  $5 \mu\text{L}$  de SytoxGreen  $30 \mu\text{M}$ . R39 e R44 correspondem às populações de células novas e velhas, respectivamente, não coradas para leitura em FL1; R41 e R45 às populações de células novas e velhas, respectivamente, não coradas para leitura em FL2; R42 e R43 correspondem às células novas coradas com IP; R46 às células velhas coradas com IP; R47 e R49 às células novas coradas com SytoxGreen; e R48 e R50 às células velhas coradas com SytoxGreen.

Da análise dos citogramas da Figura 4.5, conclui-se que o SytoxGreen permite uma melhor separação entre as sub-populações constituídas por células novas e mortas, assegurando assim, uma melhor distinção entre células mortas e células vivas, razão pela qual se escolheu o SytoxGreen para avaliação da integridade membranar, por leitura em FL1 nos ensaios realizados posteriormente (Anexo II).

#### 4.2.1.3. Identificação das populações de *R. toruloides* e *S. obliquus* nas culturas mistas

Para que pudesse ser determinada a proporção entre células de *S. obliquus* e de *R. toruloides* em cultura mista, as amostras foram corridas no citómetro de fluxo. A partir dos citogramas correspondentes às autofluorescências, foram identificadas as duas regiões correspondentes a cada uma das duas populações, cuja distinção se baseou na diferença de dimensões e complexidade interna dos dois microrganismos, conforme já referido no Capítulo 3.5.2. Foram pré-estabelecidas as definições para *S. obliquus* e para *R. toruloides*, e a identificação das populações foi feita segundo cada uma das definições, sendo os resultados apresentados o correspondente à média dos dois valores.

Na Figura 4.6 é apresentado um exemplo de identificação das populações de *S. obliquus* e de *R. toruloides* numa cultura mista, na qual são perfeitamente diferenciáveis as populações da microalga (R2 e R3) e da levedura (R1 e R4). Foi este o raciocínio seguido, ao longo de todo o trabalho, para identificação das duas populações nas amostras com culturas mistas.

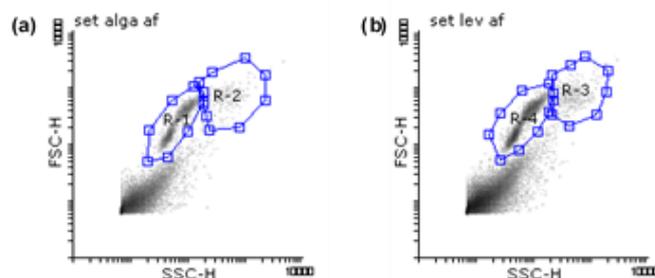


Figura 4.6: Identificação das regiões correspondentes às populações de *S. obliquus* (R2 e R3) e de *R. toruloides* (R1 e R4), com base na diferença de dimensões e complexidade interna entre os dois microrganismos e segundo as definições da (a) microalga *S. obliquus* e (b) da levedura *R. toruloides*.

## 4.2.2. Optimização do Tempo de Incubação e do Volume de Corante para a microalga *S. obliquus*

### 4.2.2.1. CFDA

Para optimização do tempo de incubação das células de *S. obliquus* com CFDA, fixou-se o volume de CFDA 10 mg/mL adicionado em 5  $\mu$ L por cada 500  $\mu$ L de amostra diluída em tampão McIlvain, e registaram-se os valores de sinal em FL1 das células coradas, obtidos para cada tempo de incubação. Da Figura 4.7(a) percebe-se que o melhor tempo de incubação é 50 min no escuro.

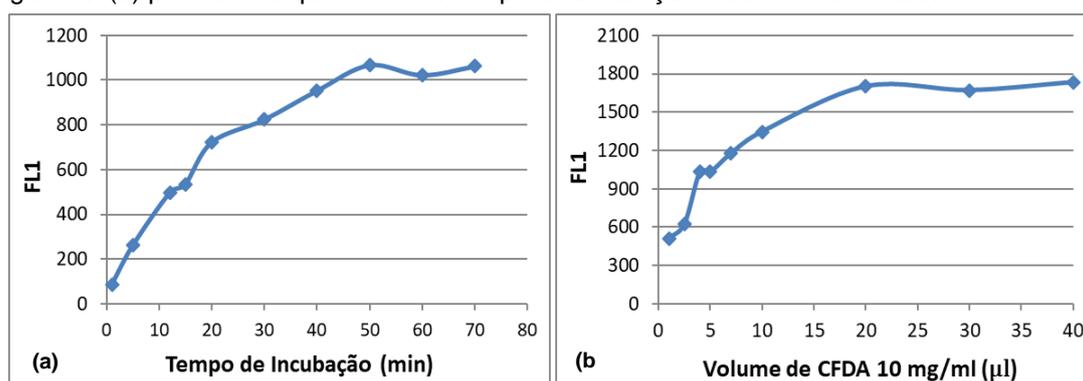


Figura 4.7: (a) Optimização do tempo de incubação de *S. obliquus* com CFDA, no escuro e fixando 5  $\mu$ L de volume adicionado de CFDA 10 mg/mL por cada 500  $\mu$ L; (b) optimização do volume de CFDA 10 mg/mL a adicionar à suspensão celular de *S. obliquus*, para um total de 500  $\mu$ L e para 50 min de incubação.

Para optimização do volume de corante a adicionar, fixou-se o tempo de incubação optimizado e variou-se o volume de CFDA 10 mg/mL a adicionar à amostra. Traçou-se a curva apresentada na Figura 4.7(b), da qual se concluiu que o volume óptimo corresponde a 20  $\mu$ L de CFDA 10 mg/mL.

### 4.2.2.2. SytoxGreen

Começou por se optimizar o volume de SytoxGreen 30  $\mu$ M a adicionar, fixando o tempo de incubação em 1 min (Figura 4.8(a)). Uma vez optimizado o volume de corante a adicionar, fez-se variar o tempo de incubação, de forma a que também este fosse optimizado (Figura 4.8(b)).

As curvas da Figura 4.8 foram traçadas com base nos valores do sinal em FL1 das células coradas, e é a partir das quais se conclui que o tempo óptimo de incubação da amostra com SytoxGreen (ao escuro) é 25 min, e que o ideal é usar 5  $\mu$ L de SytoxGreen 30  $\mu$ M por cada 500  $\mu$ L de amostra diluída em tampão PBS, ou seja, o correspondente a 0,3  $\mu$ M.

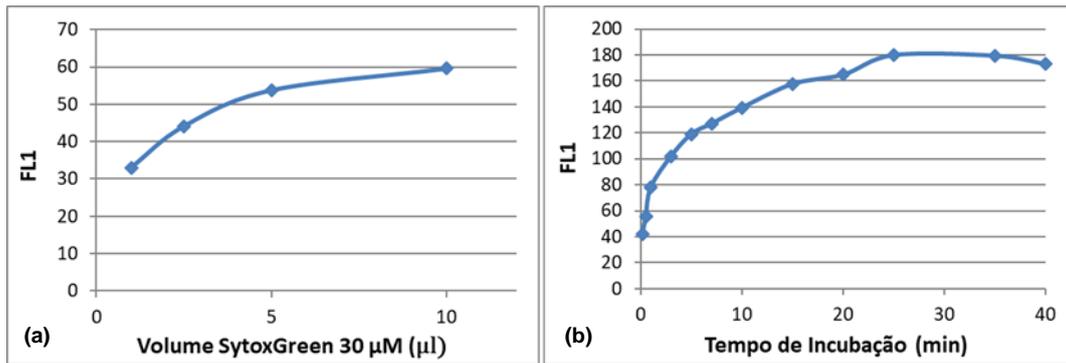


Figura 4.8: (a) otimização do volume de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$  a adicionar às amostras de *S. obliquus* diluídas em PBS, para um total de 500  $\mu\text{L}$ , e fixando 1 min de tempo de incubação; (b) Otimização do tempo de incubação de *S. obliquus* no escuro e com 5  $\mu\text{L}$  de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$  por cada 500  $\mu\text{L}$ .

### 4.2.3. Aplicação das Condições Seleccionadas para *S. obliquus* a *R. toruloides*

#### 4.2.3.1. CFDA

Amostras de células colhidas de uma cultura em fase exponencial (designadas por vivas) e de células incubadas a 100°C durante 20 min (designadas por mortas) de *R. toruloides*, foram diluídas com tampão Mcllvain e incubadas durante 50 min no escuro, com 20  $\mu\text{L}$  de CFDA 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , para um total de 500  $\mu\text{L}$ , tal como se procedeu com as células de *S. obliquus*. Após o tempo de incubação, as amostras foram analisadas no citómetro de fluxo, estando os citogramas correspondentes apresentados na Figura 4.9. Conclui-se que o aumento de sinal em FL1 para as células vivas foi superior ao das mortas, o que revela que a coloração é superior para estas células (foram coradas 95,1% das células vivas e 10,3% das células mortas, correspondente às regiões R52 e R10, respectivamente) e, portanto, o resultado é o esperado, uma vez que a CFDA cora células com actividade enzimática. Confirma-se assim, a aplicabilidade em células de *R. toruloides* das condições optimizadas para a CFDA com células de *S. obliquus*.

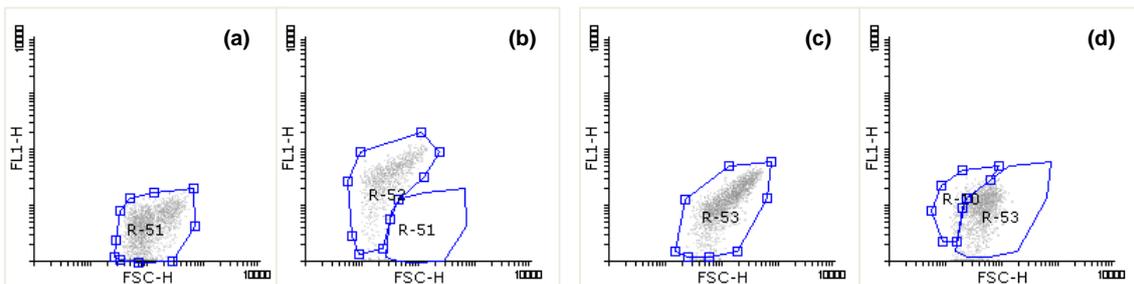


Figura 4.9: (a) e (c) Citogramas correspondentes às autofluorescências das amostras de células vivas e de células mortas de *R. toruloides*, respectivamente, diluídas em tampão Mcllvain; (b) e (d) são as correspondentes leituras após 50 min de incubação com 20  $\mu\text{L}$  de CFDA 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , para um total de 500  $\mu\text{L}$  de amostra. R51 e R52 são, respectivamente, correspondentes às células vivas não coradas e coradas; R53 e R10, às células mortas não coradas e coradas, respectivamente.

#### 4.2.3.2. SytoxGreen

De forma a verificar se também se pode aplicar a *R. toruloides* as condições optimizadas para o SytoxGreen feitas com a microalga *S. obliquus*, incubaram-se células vivas e células mortas da levedura com 5  $\mu\text{L}$  de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ , por cada 500  $\mu\text{L}$  de amostra diluída em tampão PBS, durante 25 min no escuro. Os citogramas obtidos são apresentados na Figura 4.10.

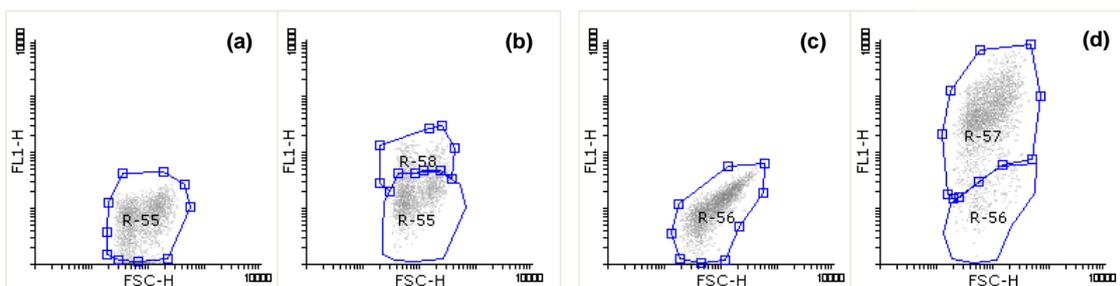


Figura 4.10: (a) e (c) Citogramas correspondentes às autofluorescências das amostras de células vivas e de células mortas de *R. toruloides*, respectivamente, diluídas em tampão PBS; (b) e (d) são as correspondentes leituras após 25 minutos de incubação com 5  $\mu\text{L}$  de SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ , para um total de 500  $\mu\text{L}$  de amostra. R55 e R58 são, respectivamente, correspondentes às células vivas não coradas e coradas; R56 e R57, às células mortas não coradas e coradas, respectivamente.

Confirma-se que as células mortas de *R. toruloides* apresentam sinal em FL1 muito superior ao obtido para as células vivas quando coradas com SytoxGreen nas condições otimizadas para a microalga *S. obliquus* (foram coradas 21,1% das células vivas e 86,1% das células mortas, correspondente às regiões R58 e R57, respectivamente). E assim, confirma-se que também o SytoxGreen pode ser utilizado para detectar a integridade membranar das células de *R. toruloides* nas condições otimizadas para as células de *S. obliquus*.

### 4.3. Crescimento de *S. obliquus* em Efluente e em Efluente Suplementado com Baixas Concentrações de Açúcares Totais

#### 4.3.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento

Neste estudo, a microalga *S. obliquus* foi incubada durante 8 d em efluente e nas seguintes concentrações de açúcares totais: 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L.

O crescimento das microalgas foi seguido por leitura diária da densidade óptica a 540 nm ( $DO_{540\text{ nm}}$ ), sendo as curvas correspondentes aos crescimentos em cada concentração as apresentadas na Figura 4.11. O melaço de cana-de-açúcar é fortemente ácido e castanho escuro (Yan et al., 2011), e em consequência da cor característica que apresenta, a adição de melaço ao meio interfere com a  $DO_{540\text{ nm}}$  da cultura. Assim, ensaios com maior concentração de açúcares totais no meio e, portanto, com maiores adições de melaço, têm à partida valores superiores de  $DO_{540\text{ nm}}$ . De forma a eliminar a interferência do melaço, as curvas foram normalizadas, subtraindo a cada leitura  $X_t$  a leitura inicial  $X_0$ .

Foram atingidas as máximas concentrações de biomassa,  $X_{m\acute{a}x}(DO_{540\text{ nm}})$ , na cultura desenvolvida em efluente suplementado com 5 g/L de açúcares totais. Este resultado é concordante com o estudo realizado por El-Sheekh et al. (2013), desenvolvido com *S. obliquus* também em diferentes concentrações de melaço de cana-de-açúcar, com o qual também concluíram que as maiores DO eram obtidas com o crescimento em 5 g/L de açúcares totais. Foram ainda verificados valores elevados  $X_{m\acute{a}x}(DO_{540\text{ nm}})$  para os crescimentos apenas em efluente e em efluente suplementado com 10 g/L de açúcares totais. Verifica-se ainda, que aumentando a quantidade de melaço no meio, aumentou o período de fase de latência e reduziu o  $X_{m\acute{a}x}$ , o que pode ser devido a compostos inibitórios presentes no melaço (Freitas et al., 2014b).

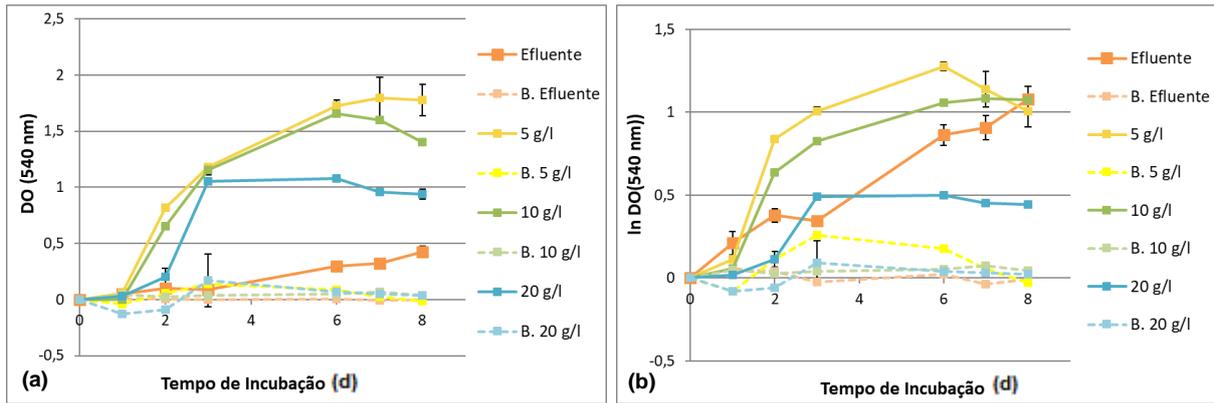


Figura 4.11: Variação de (a) DO(540 nm) e (b) ln DO(540nm) durante o tempo de crescimento (em d), nas condições de ensaio e para cada condição em estudo. “B.” representa o Branco de cada condição.

A partir das curvas da Figura 4.11 foram determinadas as  $\mu$  e os  $t_d$  das culturas, estando os valores obtidos resumidos na Tabela 4.2.

No fim do ensaio, foram traçadas as curvas de calibração do peso seco com a  $DO_{540\text{ nm}}$  (Figura 4.12), de forma a que as leituras de  $DO_{540\text{ nm}}$  (lidas usando água como branco) pudessem ser convertidas em concentração de biomassa (g/L), com as quais se determinou  $X_{m\acute{a}x}$ (g/L) e  $P_{X,m\acute{a}x}$  para cada concentração em estudo, estando os valores obtidos também resumidos na Tabela 4.2.

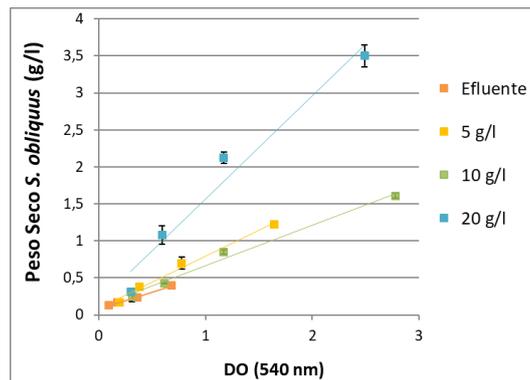


Figura 4.12: Rectas de calibração de peso seco em função DO(540 nm), traçadas no último dia de ensaio.

Tabela 4.2: Valores de concentração máxima de biomassa ( $X_{m\acute{a}x}$ ), produtividade volumétrica máxima ( $P_{X,m\acute{a}x}$ ), tempo de duplicação ( $t_d$ ), e de taxa específica de crescimento máxima ( $\mu$ ), para cada concentração de açúcar.

	Efluente	5 g/L	10 g/L	20 g/L
$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$0,37 \pm 0,15$	$1,49 \pm 0,08$	$1,60 \pm 0,07$	$4,00 \pm 0,15$
$P_{X,m\acute{a}x}$ (g/(L · d))	$0,02 \pm 0,15$	$0,17 \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,13$
$t_d$ (d)	$4,03 \pm 0,88$	$0,95 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,03$	$1,85 \pm 0,27$
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	$0,17 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,04$

A concentração para a qual se verificou um  $\mu$  superior e um  $t_d$  menor, foi 5 g/L. No entanto o maior valor de  $P_{X,m\acute{a}x}$  foi verificado para 20 g/L, o que levanta algumas dúvidas devido à eventual contribuição do melão nas medições de peso seco. Este resultado sugere que o branco (respectivo a cada amostra) deveria ter sido filtrado em separado, para que no final, ao peso do meio com biomassa, pudesse ser subtraído o peso do meio. Com esta aproximação seria possível obter apenas o peso em biomassa.

O crescimento foi também seguido através da contagem de células ao microscópio (Figura 4.13).

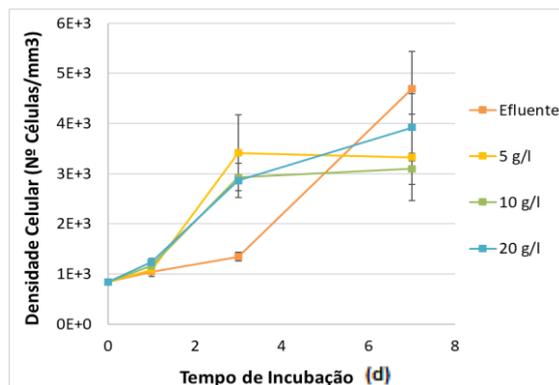


Figura 4.13: Curvas de densidade celular em função do tempo de incubação, para as concentrações de açúcares totais em estudo. A contagem de células foi feita por microscopia óptica, com ampliação de 400x.

As maiores densidades celulares são verificadas para os crescimentos em efluente e em 20 g/L de açúcares totais (Figura 4.13). Para o crescimento apenas em efluente, os resultados obtidos da contagem de células e das leituras da  $DO_{540\text{ nm}}$  são concordantes; no entanto, para 5 g/L e 20 g/L não o são, uma vez que 20 g/L é a concentração com menores valores de  $DO_{540\text{ nm}}$  mas com maior densidade celular e, 5 g/L é a concentração com maiores  $\mu$  e  $X_{m\acute{a}x}(DO_{540\text{ nm}})$  mas uma das concentrações com menor densidade celular.

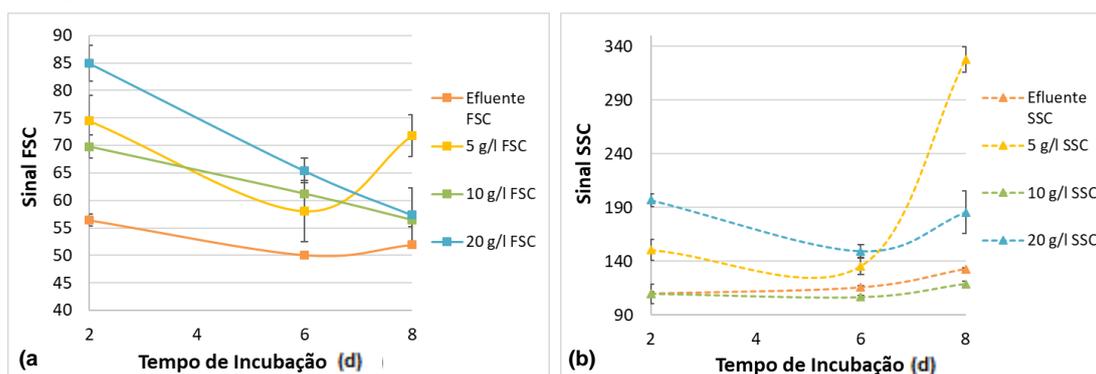


Figura 4.14: (a) Sinal em FSC e (b) sinal SSC, em função do tempo de incubação (em d).

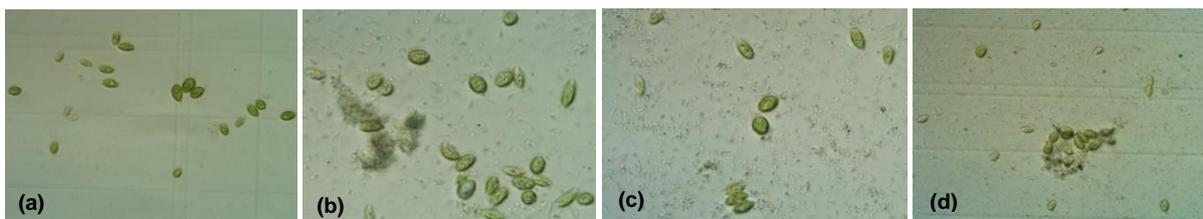


Figura 4.15: Fotografias obtidas ao 7º dia de incubação, com ampliação de 400x. (a) Efluente, (b) 5 g/L, (c) 10 g/L e (d) 20 g/L de açúcares totais.

Foi feita a análise de FSC e SSC (Figura 4.14), pela qual se percebe que as células em crescimento em 5 g/L são maiores (maiores valores de FSC) e mais complexas (maiores valores de SSC), o que justifica o facto do crescimento a 5 g/L apresentar valores de  $\mu$  e  $X_{m\acute{a}x}(DO_{540\text{ nm}})$  maiores apesar da menor densidade celular. Por outro lado, para o crescimento em 20 g/L, verificam-se sinais de FSC e de SSC superiores aos obtidos para os restantes crescimentos, com excepção de 5 g/L de açúcares totais, o que sugere a presença de agregados celulares, em consequência destes emitirem sinais elevados de FSC e SSC (os agregados celulares emitem sinais em FSC e SSC mais elevados, devido à sua dimensão e complexidade).

Da análise ao microscópio (Figura 4.15) verificou-se que as células em crescimento em 20 g/L de açúcares totais eram menores e formavam agregados celulares maiores, justificando as maiores densidades celulares apesar das menores  $\mu$  e  $X_{m\acute{a}x}(DO_{540\text{ nm}})$ . A formação dos agregados celulares a 20 g/L sugere a existência de condições adversas à microalga (Lüring, 2003).

Tendo em conta a incoerência dos resultados obtidos para  $X_{m\acute{a}x}(g/L)$  e  $P_{X,m\acute{a}x}$  a partir das curvas de calibração de peso seco traçadas, optou-se por monitorizar o crescimento das culturas com base nos valores de  $DO_{540\text{ nm}}$  ao invés de  $X(g/L)$ .

A produtividade lipídica mais elevada foi observada para o crescimento em 20 g/L de açúcares totais (2,6% (p/p)) (Figura 4.16). No entanto, a produção de ácidos gordos foi muito baixa para todas as concentrações estudadas (1,8 – 2,6% (p/p)), uma vez que segundo Becker (2007), a microalga *S. obliquus* é capaz de acumular 12,0 – 14,0% (p/p) de lípidos, tendo sido, assim, os teores em lípidos conseguidos com os crescimentos muito reduzidos.

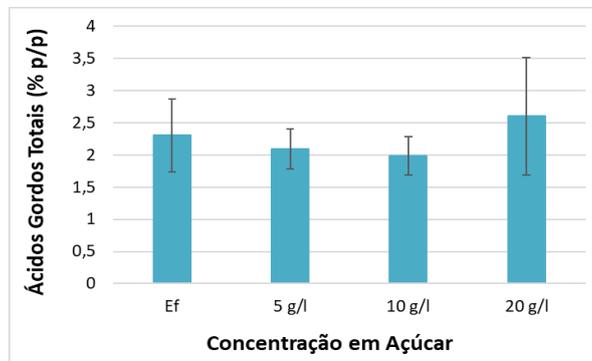


Figura 4.16: Teor de ácidos gordos da biomassa de *S. obliquus* colhida a t=8 d (n=4).

A variação de pH das culturas está apresentada na Figura 4.17. Antes de se colocar os frascos com o meio a esterilizar, o pH inicial foi acertado a 7,0 e, portanto, as diferenças de pH verificadas para o tempo inicial de crescimento, entre as várias culturas, são o resultado das mudanças de pH resultantes do processo de autoclavagem (mais notório em soluções autoclavadas com pH entre 3-9, como é o caso) (Vacín & Went, 1949).

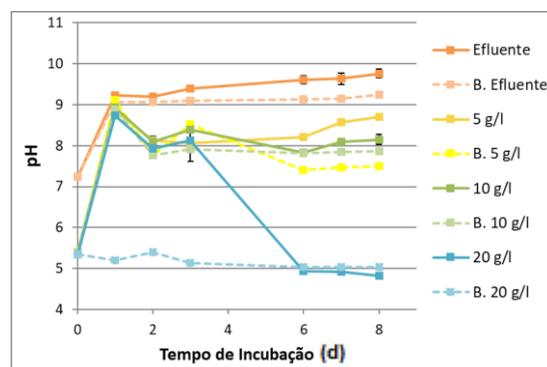


Figura 4.17: Variações do pH das culturas e respectivos brancos (B.), partindo de pH inicial 7,0.

Em regime autotrófico, e ao contrário do que acontece em heterotrofia, a remoção do  $CO_2$  do meio tem associado um consumo de iões  $H^+$ , resultando no aumento do pH do meio (Holanda & Vinícius, 2010). Assim, por análise da Figura 4.17, percebe-se, pelo menos para o crescimento em 20 g/L de açúcares

totais em que não se regista um aumento de pH, que a microalga não seguiu a via autotrófica, tendo seguido, muito provavelmente, um comportamento mixotrófico. Shamala et al. (1982) tinha já chegado a esta conclusão, quando ao sujeitar a microalga a meios suplementados com açúcar, nomeadamente por adição de melaço de cana-de-açúcar, esta optou pelo mixotrofismo

### 4.3.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar

Para 5 g/L de açúcares totais, a percentagem de células em actividade enzimática aumenta progressivamente ao longo do crescimento (Figura 4.18(a)). Nos restantes crescimentos, a actividade enzimática diminui até ao início da fase estacionária. Isto é justificado pelo facto da cultura em crescimento em 5 g/L apresentar um  $\mu$  e um  $X_{m\acute{a}x}$  superiores, revelando que a cultura não sofreu significativas limitações nutricionais ou inibições.

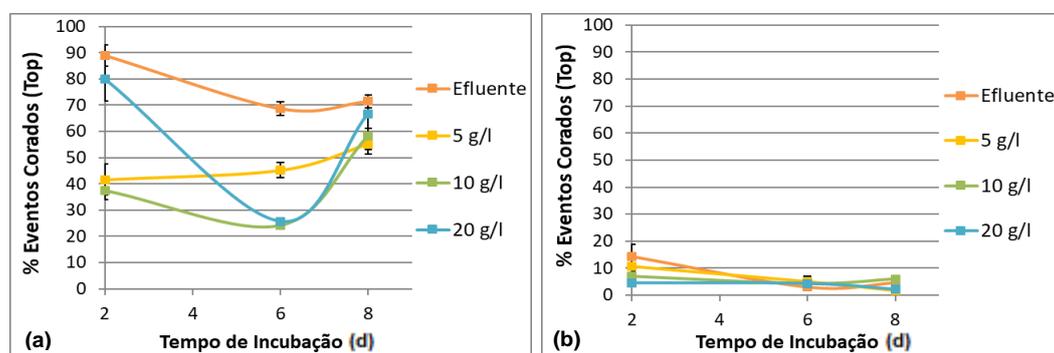


Figura 4.18: Curvas traçadas com base na informação obtida por citometria de fluxo, tendo sido a análise feita para um volume final de 500  $\mu\text{L}$  e aproximadamente 400 eventos/s. (a) A diluição das amostras foi feita com tampão McIlvain e a incubação feita com 20  $\mu\text{L}$  de corante CFDA 10 mg/mL, no escuro, durante 50 min; (b) A diluição foi feita com tampão PBS e a incubação feita com 5  $\mu\text{L}$  de corante SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ , no escuro, durante 20 min.

Observou-se diferença na percentagem de células com actividade enzimática no início das culturas (Figura 4.18(a)). A maior percentagem de células com actividade enzimática no início do crescimento apenas em efluente, deve-se à diferença de pH inicial verificada neste ensaio (o pH inicial foi 7,3 enquanto o pH inicial das culturas suplementadas foi muito mais ácido, pH inicial 5,5), pois as células sujeitas a pH mais ácido tiveram de adaptar o seu metabolismo a essa condição que lhes é adversa, canalizando  $C$  para essa adaptação em vez de o utilizarem para crescimento. Isto explica o porquê das células em crescimento apenas em efluente (que não necessitaram desse processo de adaptação) apresentarem no início do crescimento valores de actividade enzimática muito superiores às células em crescimento em 5 g/L e em 10 g/L de açúcares totais. A elevada percentagem de células coradas com CFDA na cultura desenvolvida a 20 g/L de açúcares totais, face aos restantes crescimentos em meio suplementado, pode ser consequência da predominância da microalga pelo mixotrofismo. Esta característica pode ter levado a que o pH ácido inicial do meio não se tenha traduzido numa condição tão adversa ao seu metabolismo como nos crescimentos em concentrações de açúcares totais no meio menores.

No início do ensaio a percentagem de células com membrana danificada variou de 4 – 14% (Figura 4.18(b)) e, no final da cultura, de 1,5 – 6%, de onde se conclui que houve um ligeiro aumento da integridade membranar com o tempo de crescimento para todos os ensaios. A concentração para a

qual se verificou, no final da cultura, uma fragilidade membranar superior, mas ainda assim bastante baixa, foi a de 10 g/L de açúcares totais, que atingiu os 6%. O que revela, que mais ou menos adaptada, a microalga se desenvolveu em todas as concentrações de açúcares totais estudadas.

### 4.3.3. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento do Efluente

#### 4.3.3.1. Carência Química de Oxigênio (CQO)

O melaço de cana-de-açúcar é uma fonte de C orgânico (Cheng et al., 2009), motivo pelo qual, ensaios com concentrações maiores de açúcares totais, correspondentes a maiores adições de melaço, têm valores iniciais de CQO superiores (Figura 4.20(a)).

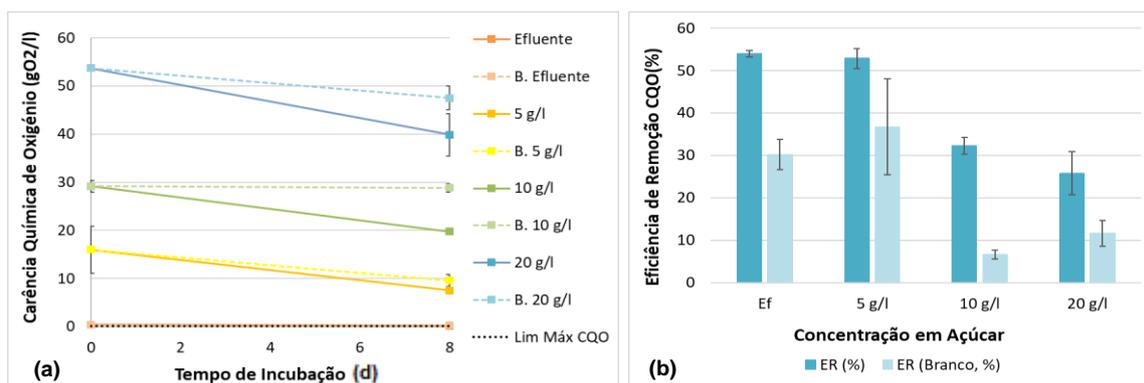


Figura 4.19: (a) Carência química de oxigênio (CQO) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios apenas em efluente e com concentrações de açúcares totais de 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 20 g/L, para cada amostra e respectivo branco; e (b) eficiências de remoção (ER) de CQO dos meios, para cada uma das concentrações estudadas e para os correspondentes brancos (B.).

A remoção de CQO é mais eficiente nos crescimentos apenas em efluente ( $ER = 54,0\%$ ;  $C_f = 0,20 \text{ gO}_2/L$ ) e em 5 g/L ( $ER = 52,9\%$ ;  $C_f = 7,54 \text{ gO}_2/L$ ) (Figura 4.19), com os quais se conseguiram ER muito semelhantes às reportadas por Ferreira (2016) e por Mata et al. (2012) cujos trabalhos também utilizaram *S. obliquus* para tratamento de efluente da indústria cervejeira (61,9% e 57,5%, respectivamente). Nas restantes condições registaram-se discrepâncias elevadas entre a carga final de CQO e o limite máximo legalmente exigido à descarga dos efluentes tratados ou à sua reutilização nos processos ( $0,15 \text{ gO}_2/L$ ), afastando-se muito do resultado esperado para um efluente tratado. Conclui-se ainda, que a fermentação de *S. obliquus* não é suficiente para remover a carga orgânica adicionada com a suplementação, fazendo com que a carga final de CQO, em qualquer ensaio suplementado, seja superior à inicial para o ensaio apenas com efluente. Considerando a baixa capacidade das microalgas de remoção do CQO, mesmo quando se desenvolvem em mixotrofia. Assim, as remoções de CQO mais eficientes pela *S. obliquus*, foram obtidas com o crescimento apenas em efluente e, não tão eficiente, mas também satisfatório, com o crescimento em 5 g/L. As positivas eficiências de remoção observadas nos brancos são, provavelmente, consequência das perdas de carbono sob a forma de ácidos voláteis e de  $CO_2$ .

#### 4.3.3.2. Nitrogênio Amoniacal

Foi feita a análise ao N –  $NH_3$ , para as amostras e respectivos brancos, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 4.20(a), bem como as correspondentes ER (Figura 4.20(b)).

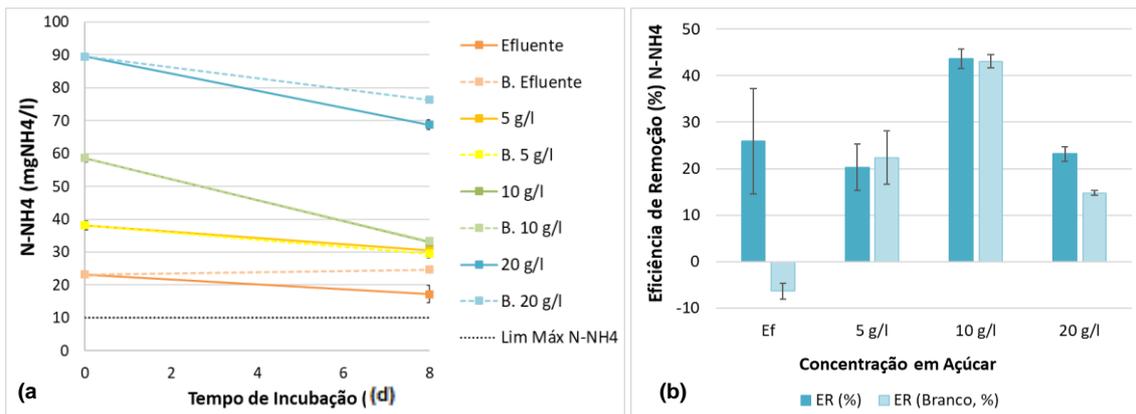


Figura 4.20: (a) Concentração de nitrogénio amoniaco ( $N-NH_3$ ) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios apenas em efluente e com concentrações de açúcares totais de 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L e 20 g/L, sendo B. correspondente ao branco de cada ensaio; e respectivas (b) ER (%), para as amostras e para os brancos.

A maior ER de  $N - NH_3$  foi conseguida para o crescimento em 10 g/L de açúcares totais (ER = 43,7%;  $C_f = 33,0 \text{ mgNH}_4/\text{L}$ ), seguida do crescimento apenas em efluente (ER = 25,9%;  $C_f = 17,2 \text{ mgNH}_4/\text{L}$ ). Para estas concentrações e para 5 g/L ( $C_f = 30,4 \text{ mgNH}_4/\text{L}$ ), a carga final de  $N - NH_3$  aproxima-se bastante do limite máximo legal para um efluente tratado (10,0  $\text{mgNH}_4/\text{L}$ ). No entanto, para 20 g/L é bastante superior à esperada após tratamento (68,8  $\text{mgNH}_4/\text{L}$ ), e superior à carga inicial do efluente não suplementado, sem tratamento. O que é justificado pela comparação das ER obtidas com as amostras e com os respectivos brancos, que são praticamente iguais, levando à conclusão de que as microalgas não removem o  $N - NH_3$ . As positivas ER são, provavelmente, o resultado da perda deste sob a forma de  $NH_3$  gasoso, em resultado do pH básico do meio (Cassini, 2012), evidenciada pelo cheiro característico detectado ao longo dos ensaios. A exceção verificada para o branco apenas com efluente, no qual houve acumulação de  $N - NH_3$ , pode ser o resultado de alguma evaporação do meio ou, pelo contrário, de uma ineficiente transferência de massa através das rolhas de algodão (que tenha impedido a perda de  $N - NH_3$  sob a forma de  $NH_3(g)$ ).

#### 4.3.3.3. Fósforo

Da análise da Figura 4.21(d), conclui-se que a remoção do P, nas 3 formas analisadas, é mais eficiente para as concentrações de 5 g/L e 10 g/L de açúcares totais. No entanto, para estas concentrações, a remoção do P nos brancos é ainda mais significativa do que na amostra, revelando que a remoção do P não é feita pelas microalgas e que, pelo contrário, estas contribuem para que a remoção não seja tão eficiente, talvez devido a fenómenos de lise celular (o P está presente nos fosfolípidos da membrana, é constituinte dos nucleóticos, etc. (Nicolau, 2014)). Isto não vai ao encontro do esperado, uma vez que as microalgas, enquanto agentes fotossintéticos, deveriam remover o P e o N do efluente. Estes resultados sugerem que *S. obliquus* ter-se-á desenvolvido em mixotrofia e não apenas em autotrofia, tendo em conta a presença de C orgânico proveniente do melaço (o que é confirmado pelo consumo de CQO, Figura 4.20). Daqui, conclui-se que este tipo de tratamento biológico, com a microalga *S. obliquus*, não é eficiente na remoção deste nutriente, o que também já tinha sido concluído por Ferreira (2016). Ainda assim, e apesar da remoção não ser feita pelas microalgas, para os crescimentos em 5 g/L e 10 g/L de açúcares totais, conseguem-se ER (ver Tabela 4.7) superiores às obtidas por Ferreira

(2016) com *S. obliquus* apenas em efluente (exactamente no mesmo efluente, mas em fotobiorreactores do tipo coluna de bolhas) (22,4%).

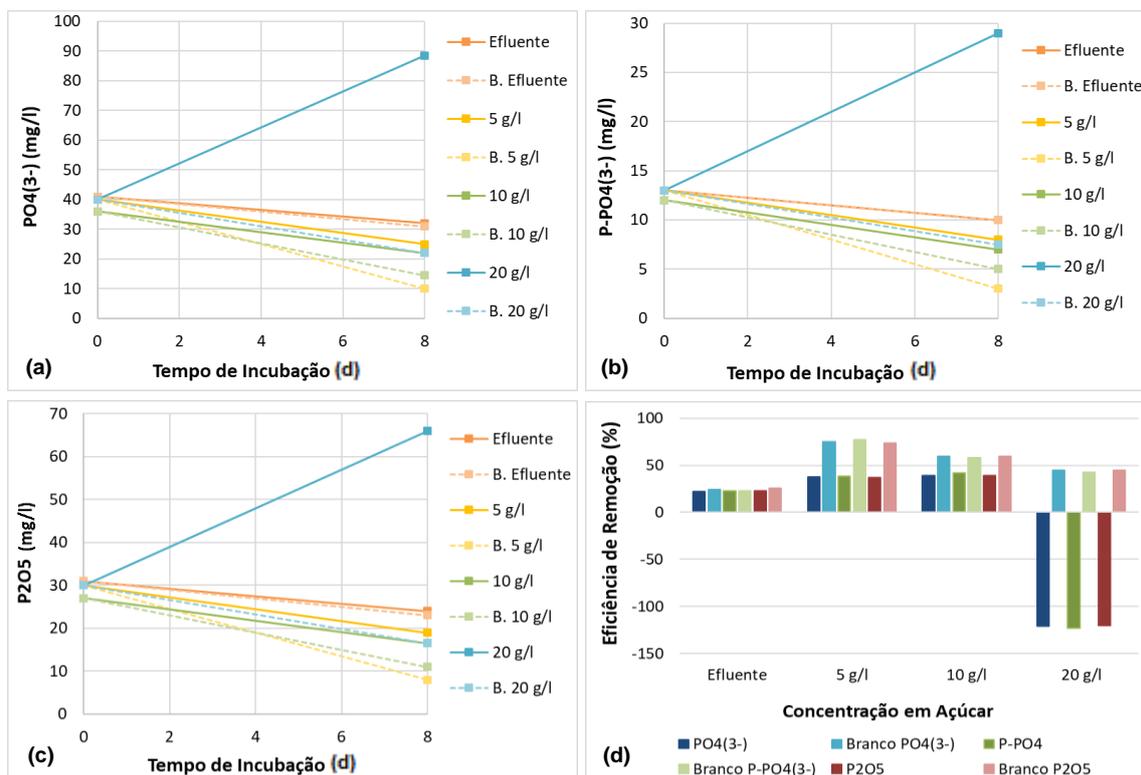


Figura 4.21: Concentração das três espécies de fósforo: (a)  $PO_4^{(3-)}$ , (b)  $P-PO_4^{(3-)}$  e (c)  $P_2O_5$ , para os tempos inicial e final de cada um dos ensaios, apenas em efluente e com concentrações de açúcares totais de 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L, para cada amostra e respectivo branco (B.); e correspondentes (d)  $ER$  (%).

#### 4.3.3.4. Remoção dos Açúcares Totais

Da análise aos principais açúcares presentes nas amostras (sacarose, glucose e frutose) (Figura 4.22), várias são as conclusões a tirar dos crescimentos de *S. obliquus* apenas em efluente e em efluente suplementado com 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L de açúcares totais, inclusivamente das vias metabólicas seguidas pela microalga em cada uma das concentrações.

Para o crescimento apenas em efluente, verifica-se que a remoção dos açúcares totais no branco (sem microrganismo) e nas amostras (com microalga *S. obliquus*) é semelhante, donde se conclui que a microalga não utilizou açúcares no seu metabolismo e crescimento, apresentando um comportamento autotrófico. Para o crescimento em 5 g/L a remoção de açúcares é mais elevada no branco do que nas amostras, o que também revela a predominância pelo autotrofismo, sendo a redução dos açúcares observada, provavelmente, o resultado da perda de açúcares totais por decomposição espontânea do melaço, pela qual, segundo Browne (1929), há a conversão espontânea dos açúcares em compostos como o ácido fórmico, o ácido acético, ácidos voláteis, etc.

Para os crescimentos em 10 g/L e em 20 g/L, a remoção dos açúcares totais é muito maior nas amostras do que nos brancos, o que revela o consumo de açúcares pela microalga e, portanto, a predominância do metabolismo mixotrófico. Isto faz com que os crescimentos nestas concentrações apresentem  $ER$  superiores às obtidas para menores concentrações de açúcares no meio, para as quais

a microalga se desenvolva em autotrofia. De facto, segundo Yang et al., (2015), *S. obliquus* quando em condições de mixotrofia/heterotrofia desenvolve uma resposta muito mais rápida de transporte e utilização de açúcares, que é cerca de cinco vezes mais eficiente que a existente em autotrofia.

Em todos os ensaios com melaço, as células consomem preferencialmente a glucose e a frutose, deixando o substrato mais complexo, a sacarose (dímero). O que está coerente com o estudo desenvolvido por Shamala et al., (1982), também com microalgas *Scenedesmus*, no qual estudaram o seu crescimento em diferentes açúcares (glucose, manose, sacarose, frutose e galactose) e pelo qual concluíram que estas têm preferência pela glucose.

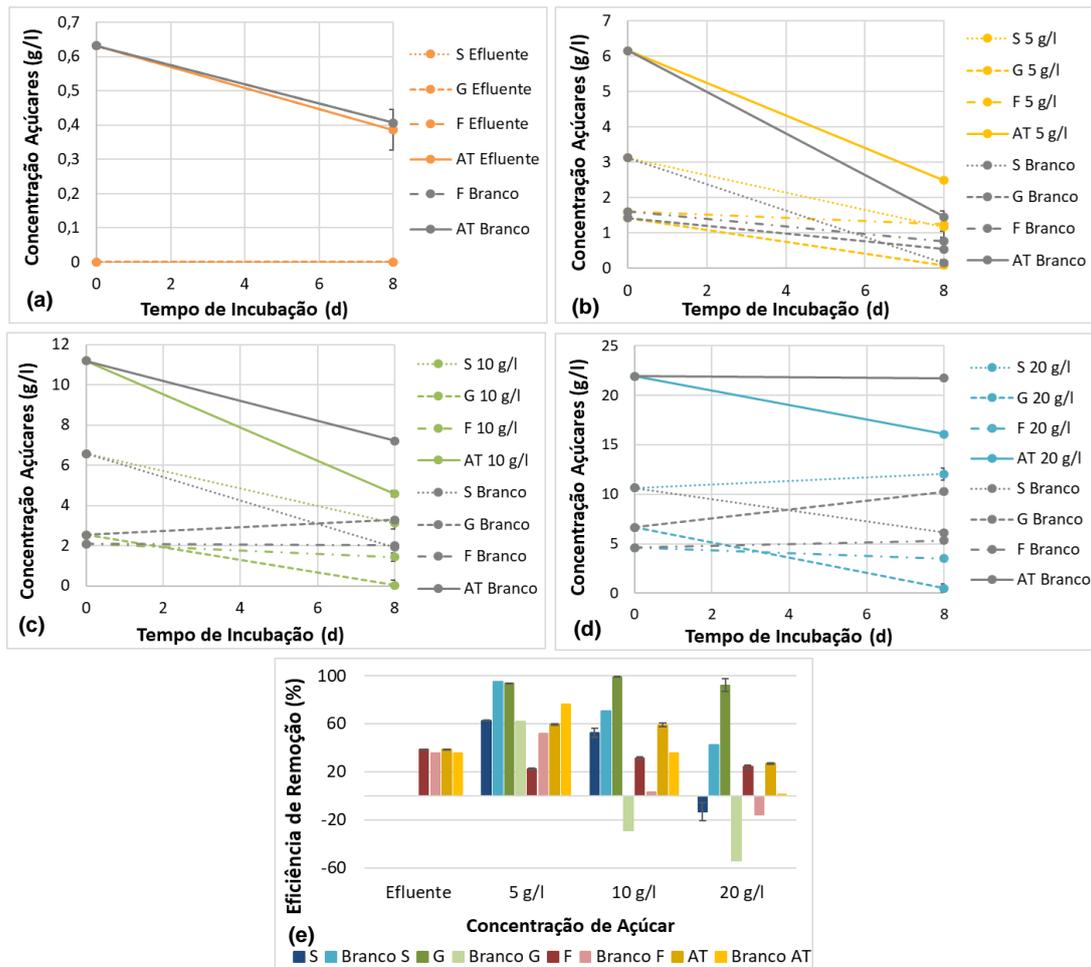


Figura 4.22: Concentração dos três açúcares principais: S-Sacarose; G-Glucose; F-Frutose e AT-Açúcares Totais, para os tempos inicial e final de ensaio, para cada amostra e respectivo branco (B.). (a) Crescimento em efluente, (b) em 5 g/L, (c) em 10 g/L e (d) em 20 g/L. (e) Respectivas ER (%).

#### 4.3.4. Resumindo

Das concentrações estudadas, 5 g/L foi a que mais favoreceu o crescimento de *S. obliquus*. O crescimento apenas em efluente foi o que assegurou um tratamento mais eficaz, permitindo que no final o efluente se aproximasse mais dos limites máximos legalmente exigidos a um efluente tratado, apesar de ainda assim ter ficado acima destes. Por outro lado, e ainda que bastante insignificante, o crescimento em 20 g/L foi o que garantiu a maior produção de ácidos gordos. Assim, optou-se por avaliar o crescimento da microalga *S. obliquus* em concentrações de açúcares totais no meio superiores a 20 g/L.

## 4.4. Crescimento de *S. obliquus* em Efluente Suplementado com Elevadas Concentrações de Açúcares Totais

### 4.4.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento

Neste ensaio, a microalga *S. obliquus* foi incubada durante 7 d nas seguintes concentrações de açúcares totais: 40 g/L e 60 g/L. O branco do ensaio a 60 g/L de açúcares totais, assim como um dos duplicados, contaminaram ao 4º dia de ensaio, motivo pelo qual deixaram de ser seguidos a partir deste dia. Na Figura 4.23, estão imagens conseguidas por microscopia óptica de dois tipos distintos de contaminações obtidas.

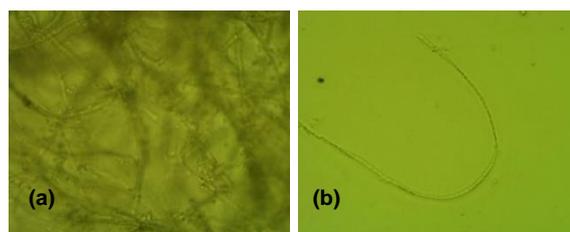


Figura 4.23: Imagens microscópicas, com ampliação de 400x, de duas contaminações obtidas. (a) Fungo filamentosos, que forma na cultura um género de pompons em suspensão; (b) Fungo filamentosos ou levedura.

O crescimento foi seguido indirectamente por leitura diária da  $DO_{540\text{ nm}}$ , estando as curvas obtidas, para cada concentração e respectivos brancos, apresentadas na Figura 4.24.

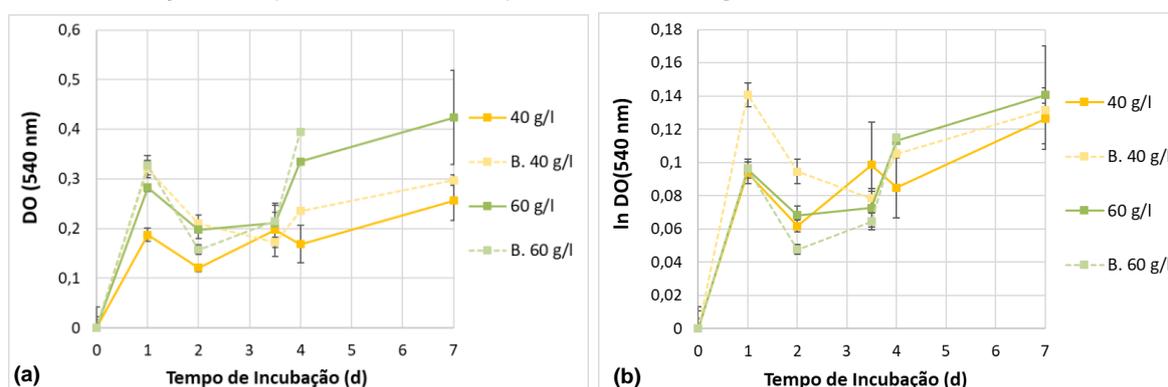


Figura 4.24: Curvas normalizadas de (a)  $DO(540\text{ nm})$  e (b)  $\ln DO(540\text{ nm})$ , em função do tempo de incubação. Sendo que B. representa o branco de cada condição.

Foi determinado as  $\mu$  e os  $t_d$  para cada crescimento, estando os valores resumidos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores de taxa específica de crescimento máxima,  $\mu$ , e de tempo de duplicação,  $t_d$ , para cada concentração de açúcar testada.

	40 g/L	60 g/L
$\mu (d^{-1})$	$0,09 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,00$
$t_d (d)$	$7,38 \pm 0,97$	$10,70 \pm 0,88$

Pelas curvas da Figura 4.24, pelos resultados da Tabela 4.3, e por comparação destes com os resultados obtidos do ensaio de *S. obliquus* até 20 g/L de açúcares totais, confirma-se que a produção de biomassa é menor para altas concentrações de açúcares totais no meio, de onde resultam valores de  $\mu$  muito inferiores e de  $t_d$  muito superiores. Yang et al., (2015) do estudo que desenvolveram com *S. obliquus* a diferentes concentrações de açúcar (utilizando xilose), concluíram que a 6 g/L já houve inibição do crescimento da microalga, pelo que já era espectável que a 40g/L e 60g/L de açúcares

totais no meio não se conseguissem significativas produções de biomassa. Além disso, é muito provavelmente que também tenha havido inibição do crescimento da microalga a estas concentrações de açúcares totais (correspondentes a maiores concentrações de melaço), devido à presença de compostos inibitórios do crescimento microbiano existentes no melaço de cana-de-açúcar, conforme reportado por Freitas et al. (2014b).

Constata-se também que para os ensaios em 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais, as culturas ao 7º dia de ensaio ainda não tinham atingido a fase estacionária, o que se justifica pelo facto do tempo necessário para uma cultura atingir a fase estacionária aumentar com a concentração de substrato (Yang et al., 2015). Ainda assim, os valores de  $DO_{540\text{ nm}}$  obtidos são muito baixos, quando comparados com os obtidos para concentrações de açúcares totais no meio menores.

O crescimento foi ainda seguido por observação ao microscópio (Figura 4.25). E, uma vez comparando as imagens das Figuras 4.15 e 4.25, facilmente se percebe as menores densidades celulares nos ensaios em maiores concentrações de açúcares totais, o que justifica os reduzidos valores de  $DO_{540\text{ nm}}$  obtidos para estas concentrações quando comparados com os obtidos para concentrações menores de açúcares totais (Figuras 4.11 e 4.23).

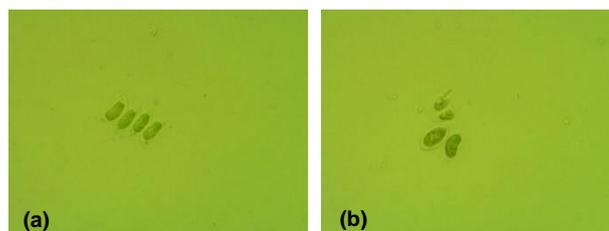


Figura 4.25: Imagens microscópicas, obtidas ao 4º dia de incubação, com ampliação de 400x, correspondentes aos crescimentos de *S. obliquus* em (a) 40 g/L e (b) 60 g/L de açúcares totais.

Foi acompanhado diariamente o pH das culturas, estando as curvas obtidas mostradas na Figura 4.26.

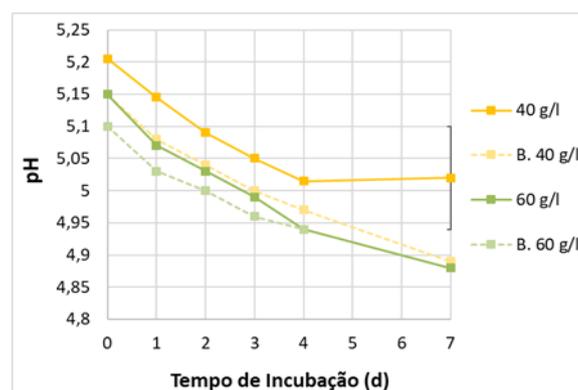


Figura 4.26: Variação do pH das culturas com o tempo de incubação, para as condições operatórias (30°C, 110 rpm e condições de esterilidade).

Através da diminuição do pH do meio, observa-se a preferência da microalga pela mixotrofia, para qualquer uma das três concentrações de açúcares totais, uma vez que a via autotrófica é caracterizada por um aumento do pH do meio, em resultado do consumo de iões  $H^+$  durante o processo de fixação de  $CO_2$  (Holanda & Vinícius, 2010).

#### 4.4.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar

As percentagens de células com actividade enzimática para os ensaios em 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais após os 7 d de crescimento, são, respectivamente, 13% e 3% (Figura 4.27(a)). Com base nestes resultados e por comparação destes com os obtidos para concentrações de açúcares totais no meio menores (% de células coradas  $\geq 55\%$ , Figura 4.18(a)), conclui-se que quando culturas puras de *S. obliquus* crescem em condições de concentrações de açúcares totais no meio elevadas, a proporção de células com actividade enzimática é menor. Sendo que a CFDA detecta especificamente a actividade das enzimas esterases, que são associadas à atividade metabólica de células saudáveis. Assim, menores percentagens de células de *S. obliquus* coradas com CFDA, sugerem menores actividades metabólicas da microalga quando desenvolvida em altas concentrações de açúcares totais.

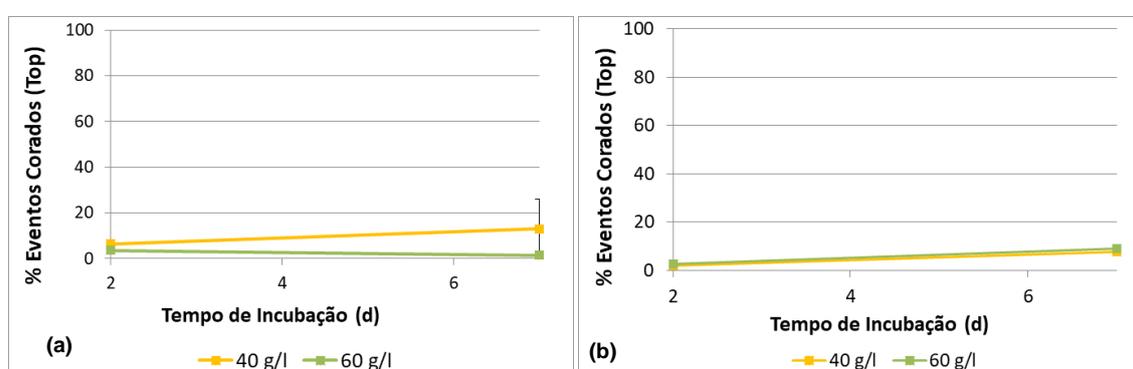


Figura 4.27: Curvas traçadas para os ensaios com 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais, com base na informação obtida por citometria de fluxo. A análise foi feita para um volume final de 500  $\mu$ l e aproximadamente 400 eventos/s. (a) A diluição das amostras foi feita com tampão McIlvain e a incubação feita com 20  $\mu$ l de corante CFDA 10 mg/ml, no escuro, durante 50 min; (b) A diluição das amostras foi feita com tampão PBS e a incubação feita com 5  $\mu$ l de corante SytoxGreen 30  $\mu$ M, no escuro, durante 20 min.

A perda de integridade celular aumenta com o aumento da concentração em açúcares totais, conforme demonstrado pelo progressivo aumento da percentagem de células coradas pelo SytoxGreen com o aumento da concentração de açúcares totais (7,6% de células com membrana permeabilizada para 40 g/L de açúcares totais; e 9,2% de células com membrana permeabilizada para 60 g/L de açúcares totais), o que é corroborado pela Figura 4.18(b), a qual mostra que para concentrações inferiores de açúcares totais, a percentagem de células coradas com SytoxGreen não superou os 6%. Além disso, da Figura 4.18(b) concluímos que a integridade membranar das células de *S. obliquus* aumentou ao longo de todos os crescimentos em concentrações inferiores de açúcares totais; da Figura 4.27(b) concluímos que a integridade membranar das células de *S. obliquus* diminuiu ao longo dos crescimentos em concentrações elevadas de açúcares totais no meio.

Ainda assim, as percentagens de células coradas com CFDA foram baixas, o que sugere que condições de elevadas concentrações de açúcares totais, afectaram a atividade enzimática das células de *S. obliquus* (impedindo o crescimento celular), mas não danificaram significativamente a membrana celular.

### 4.4.3. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento do Efluente

#### 4.4.3.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)

Com os resultados da análise ao CQO para este ensaio (Figura 4.28), e por comparação destes com os obtidos para o ensaio realizado a concentrações menores de açúcares totais no meio (Figura 4.19), percebe-se a ineficiente remoção da carga orgânica pelas microalgas *S. obliquus* quando em condições de concentrações de açúcares totais no meio elevadas.

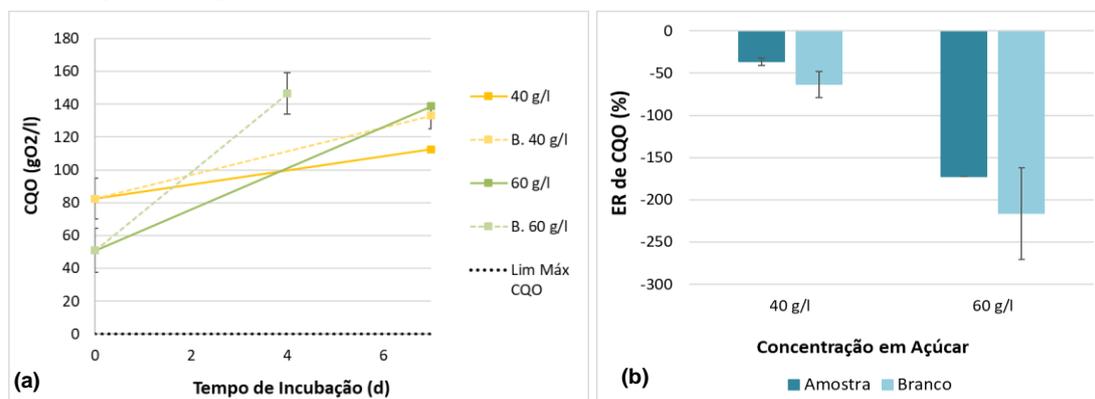


Figura 4.28: (a) Carência química de oxigénio (CQO) correspondente aos tempos inicial e final do ensaio, com concentrações de 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais, para as amostras e para os correspondentes brancos (B.), com o limite máximo de CQO legalmente exigido para descarga do efluente tratado, e (b) Eficiências de remoção (ER) de CQO dos meios, para cada ensaio.

O aumento da carga de CQO verificada para as amostras em 40 g/L e 60 g/L, por um lado é resultado do baixo metabolismo celular (confirmado pelas reduzidas percentagens de células com actividade enzimática), provavelmente por inibição por substrato, resultando num baixo consumo de matéria orgânica. Além disso, é resultado da evaporação do meio, o que também justifica a acumulação de CQO verificada nos brancos (e as diferenças observadas entre os 2 ensaios em branco), uma vez que os ensaios foram desenvolvidos em frascos agitados sem controlo das trocas mássicas através das rolhas de algodão.

#### 4.4.3.2. Nitrogénio Amoniacal

Na Figura 4.29 são apresentados os resultados da análise feita ao  $N - NH_3$ , em termos de concentrações mássicas deste contaminante e de ER, obtidas com cada ensaio e respectivo branco.

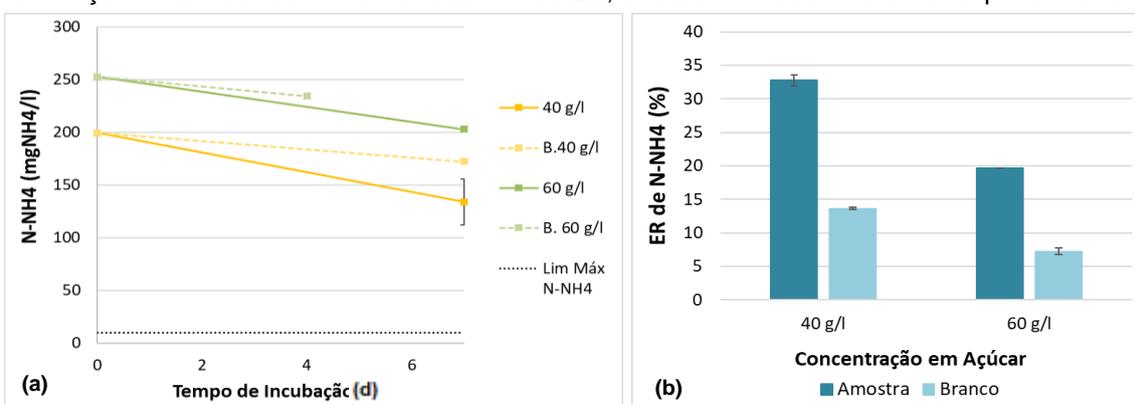


Figura 4.29: (a) Concentração de nitrogénio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) correspondente aos tempos inicial e final de ensaio para cada uma das concentrações estudadas (40 g/L, 60 g/L e 80 g/L de açúcares totais), para as amostras e para os correspondentes brancos (B.); e respectivas (b) Eficiências de Remoção (ER) (%).

Percebe-se que da elevada suplementação com melação de cana-de-açúcar, resulta a adição de elevadas cargas de  $N - NH_3$  ao efluente, o que, associado às baixas  $ER$  pelas microalgas (conforme já foi concluído acima), impede que no final do tratamento as cargas em  $N - NH_3$  ( $134,0 \text{ mgNH}_4/\text{L}$  para  $40 \text{ g/L}$  e  $202,7 \text{ mgNH}_4/\text{L}$  para  $60 \text{ g/L}$  de açúcares totais) se aproximem da legalmente exigida ( $10,0 \text{ mgNH}_4/\text{L}$ ).

#### 4.4.3.3. Fósforo

Através das curvas apresentadas na Figura 4.30, conclui-se que para a concentração de  $60 \text{ g/L}$  de açúcares totais, ocorre um aumento da concentração das três espécies de  $P$  no final do ensaio. O que pode ser explicado como consequência da ineficiente remoção do  $P$  pelas microalgas, como já foi concluído no Capítulo 4.3.3.3, em associação a fenômenos de evaporação. Para o crescimento em  $40 \text{ g/L}$  de açúcares totais, as  $ER$  das três espécies de  $P$  do meio são positivas ( $ER_{PO_4^{3-}} = 7,5\%$ ,  $ER_{P-PO_4^{3-}} = 7,7\%$  e  $ER_{P_2O_5} = 7,8\%$ ), no entanto bastante inferiores às conseguidas com os crescimentos apenas em efluente ( $ER_{PO_4^{3-}} = 22,0\%$ ,  $ER_{P-PO_4^{3-}} = 23,1\%$  e  $ER_{P_2O_5} = 22,6\%$ ), e em  $5 \text{ g/L}$  ( $ER_{PO_4^{3-}} = 37,5\%$ ,  $ER_{P-PO_4^{3-}} = 38,5\%$  e  $ER_{P_2O_5} = 36,7\%$ ) e  $10 \text{ g/L}$  ( $ER_{PO_4^{3-}} = 38,9\%$ ,  $ER_{P-PO_4^{3-}} = 41,7\%$  e  $ER_{P_2O_5} = 38,9\%$ ) de açúcares totais. As concentrações finais das três espécies de  $P$ , conseguidas com os ensaios a  $40 \text{ g/L}$  ( $55,5 \text{ g/L}$  de  $PO_4^{3-}$ ,  $18,0 \text{ g/L}$  de  $P - PO_4^{3-}$  e  $41,5 \text{ g/L}$  de  $P_2O_5$ ) e a  $60 \text{ g/L}$  ( $72,0 \text{ g/L}$  de  $PO_4^{3-}$ ,  $23,5 \text{ g/L}$  de  $P - PO_4^{3-}$  e  $54,0 \text{ g/L}$  de  $P_2O_5$ ) de açúcares totais, são também superiores às conseguidas com o crescimento só em efluente ( $32,0 \text{ g/L}$  de  $PO_4^{3-}$ ,  $10,0 \text{ g/L}$  de  $P - PO_4^{3-}$  e  $24,0 \text{ g/L}$  de  $P_2O_5$ ) e em  $5 \text{ g/L}$  ( $25,0 \text{ g/L}$  de  $PO_4^{3-}$ ,  $8,0 \text{ g/L}$  de  $P - PO_4^{3-}$  e  $19,0 \text{ g/L}$  de  $P_2O_5$ ) e  $10 \text{ g/L}$  ( $22,0 \text{ g/L}$  de  $PO_4^{3-}$ ,  $7,0 \text{ g/L}$  de  $P - PO_4^{3-}$  e  $16,5 \text{ g/L}$  de  $P_2O_5$ ) de açúcares totais, conforme se encontra resumido na Tabela 4.7.

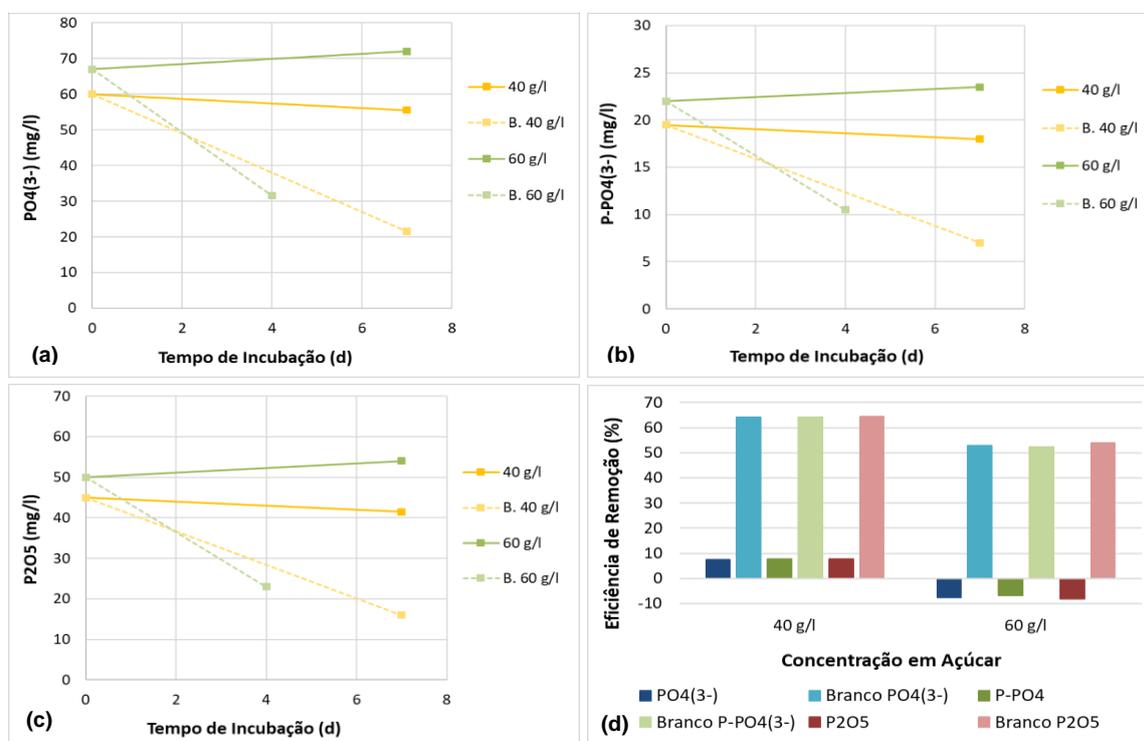


Figura 4.30: Concentração das três espécies de fósforo: (a)  $PO_4^{3-}$ , (b)  $P-PO_4^{3-}$  e (c)  $P_2O_5$ , para os tempos inicial e final de cada um dos ensaios (em  $40 \text{ g/L}$ ,  $60 \text{ g/L}$  e  $80 \text{ g/L}$  de açúcares totais) e respectivos brancos (B.); (d) correspondentes Eficiências de remoção ( $ER$ ) (%).

Apesar das superiores *ER* obtidas com os crescimentos em concentrações de açúcares totais menores, as *ER* do *P* foram, para todos os crescimentos com excepção do apenas em efluente, inferiores às conseguidas com os ensaios em branco correspondentes, o que comprova que as microalgas *S. obliquus* não removem o *P* presente no efluente suplementado com melaço. O que está completamente de acordo com os resultados obtidos por Raposo et al., (2010), no estudo que desenvolveram também com aplicação de microalgas ao tratamento de efluentes da indústria cervejeira, com o qual concluíram a ineficiência de remoção de *P* por estes microrganismos, e no qual também obtiveram eficiências de remoção superiores no ensaio controlo.

#### 4.4.3.4. Remoção dos Açúcares Totais

A remoção de açúcares é muito ineficiente em crescimentos em 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais (Figura 4.31). Tal como já foi referido acima, isto pode ser explicado pela reduzida actividade metabólica das microalgas *S. obliquus* quando sujeitas a elevadas concentrações de açúcares totais no meio, à inibição do crescimento da microalga pelo substrato e/ou pelos compostos tóxicos/inibidores presentes no melaço (Freitas et al., 2014b). O aumento da concentração de açúcares registado para alguns ensaios, inclusive para os brancos, é o resultado simultâneo do não consumo destes e da evaporação do meio.

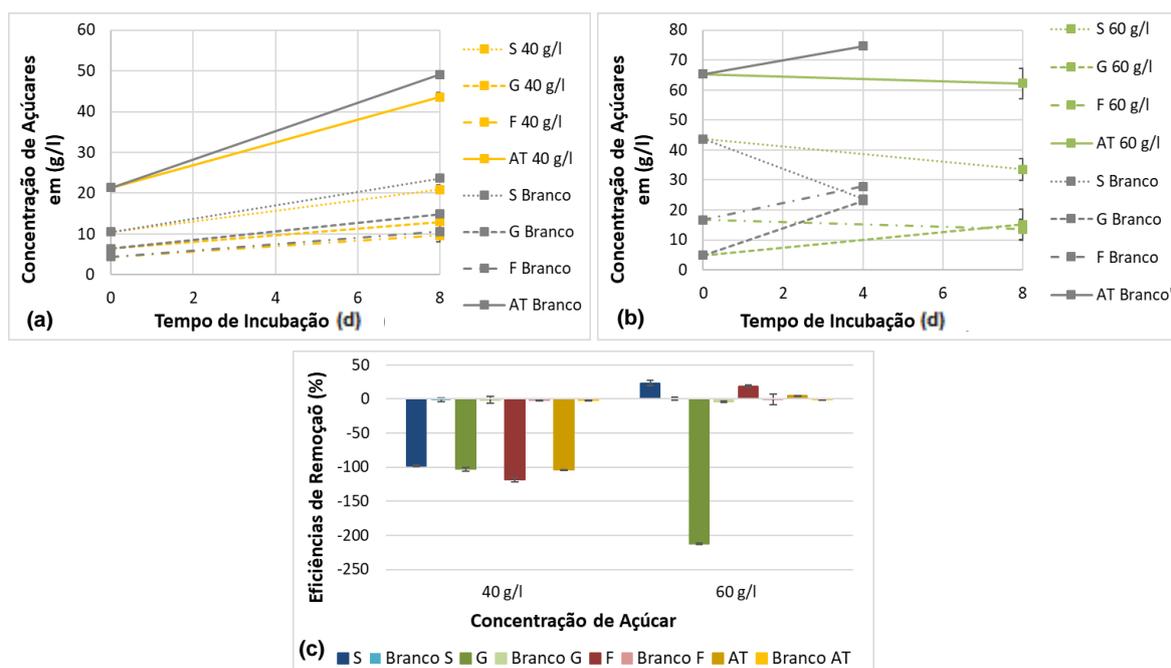


Figura 4.31: Concentração dos três açúcares principais: S-Sacarose; G-Glucose e F-Frutose, e ainda dos AT-Açúcares Totais, para os tempos inicial e final dos ensaios a (a) 40 g/L e (b) 60 g/L de açúcares totais. (c) Respectivas Eficiências de remoção (*ER*) (%). B. corresponde ao branco de cada amostra.

#### 4.4.4. Resumindo

Percebeu-se que o crescimento e a viabilidade celulares de *S. obliquus*, são afectados quando sujeitas a condições de açúcares totais no meio em concentrações superiores a 20 g/L, pelo menos para condições de cultura pura. Motivo pelo qual não foi feito, no último dia de ensaio, a análise aos ácidos gordos, uma vez que por muito satisfatória que esta pudesse ser, o processo de tratamento nestas

condições nunca seria viável, atendendo à ineficiente remoção dos contaminantes, às baixas densidades celulares e às reduzidas actividades celulares.

## 4.5. Crescimento de *R. toruloides* em Efluente e em Efluente Suplementado com Melaço de Cana-de-Açúcar

### 4.5.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento

Este ensaio estudou o crescimento da levedura *R. toruloides* em efluente e em efluente suplementado a 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais. Os crescimentos foram seguidos durante 8 d, até que as culturas atingissem a fase estacionária, com excepção do ensaio em 20 g/L que decorreu durante 10 d (uma vez que ao 8º dia parecia ainda não ter atingido a fase estacionária). As culturas foram acompanhadas indirectamente por leitura diária da  $DO_{600\text{ nm}}$ , estando as curvas obtidas apresentadas na Figura 4.32.

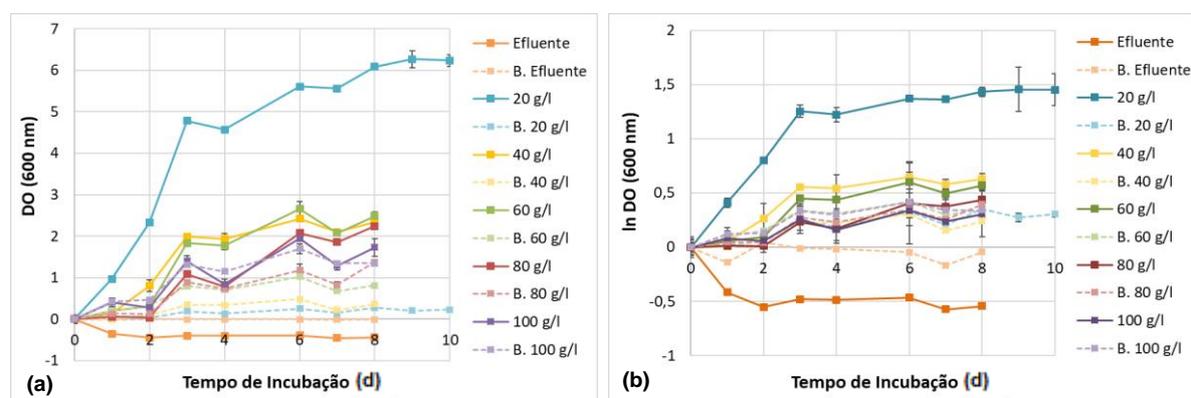


Figura 4.32: Curvas normalizadas, de forma a não ter interferência do melaço, da variação de (a)  $DO_{600\text{ nm}}$  e (b)  $\ln DO_{600\text{ nm}}$  durante os crescimentos, nas condições de ensaio (pH inicial 4,0; 30°C e 150 rpm) e para os ensaios apenas em efluente, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, e respectivos brancos

Conforme observável na Figura 4.32, a levedura não cresce em meio apenas de efluente. Este resultado é espectacular, já que se trata de um microrganismo heterotrófico e, como tal, necessita de ter como substrato compostos orgânicos, praticamente ausentes no efluente não suplementado. A concentração de açúcares totais para a qual o crescimento foi mais significativo, foi 20 g/L, obtendo-se valores de  $X_{máx}(DO_{600\text{ nm}})$  superiores, chegando a atingir os 6,27. Para as restantes concentrações estudadas, quanto maior a concentração de açúcares totais no meio, menores os valores de  $DO_{600\text{ nm}}$  conseguidos. Tal observação não deve ser consequência de inibição pela excessiva disponibilidade de açúcar no meio, uma vez que segundo Li et al. (2007), só há inibição do crescimento de *R. toruloides* por excesso de açúcares totais no meio para concentrações superiores a 100 g/L. E, portanto, sugere inibição por inibidores de crescimento e/ou limitação de  $O_2$  ou de outro nutriente que não o C. De facto, Taskin et al. (2016) reportaram que os compostos nitrogenados do melaço não garantem o crescimento de leveduras nem a produção de lípidos por estas (sendo necessária a suplementação com uma fonte de N adicional), e concluíram ainda, que concentrações superiores de melaço implicam concentrações menores de biomassa. Isto pode ser a justificação para o menor crescimento de *R. toruloides* em concentrações de açúcares totais superiores, às quais correspondem maiores adições de melaço, e ainda pelo facto de não ter sido adicionado N ao meio e a carga do efluente em N não ser significativa. Além disso, o melaço de cana-de-açúcar contém outros inibidores do crescimento microbiano,

conforme reportado por Freitas et al. (2014b), como compostos fenólicos que actuam sobre as membranas biológicas provocando a desintegridade da membrana, e ainda compostos fenólicos ácidos que destroem o gradiente electroquímico das membranas mitocondriais e citoplasmáticas, o que também pode ser a causa da diminuição do crescimento de *R. toruloides* com o aumento da suplementação.

Para o último dia de ensaio, foram traçadas as curvas de calibração de peso seco em função da  $DO_{600\text{ nm}}$ , de forma a que pudessem ser determinadas as produtividades para cada concentração estudada (Figura 4.33). Foram ainda determinados os valores de  $\mu$  e  $t_d$  para cada um dos crescimentos, estando os resultados obtidos resumidos na Tabela 4.4.

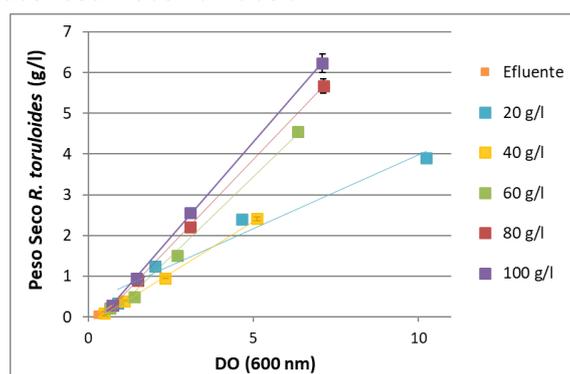


Figura 4.33: Curvas de calibração de peso seco em função da DO (600 nm), traçadas no último dia de ensaio para cada um dos crescimentos: apenas em efluente, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais..

Tabela 4.4: Valores de produtividade volumétrica máxima,  $P_{X,máx}$ , de tempo de duplicação,  $t_d$ , e de taxa específica de crescimento máxima,  $\mu$ , para cada concentração de açúcar testada.

	Efluente	20 g/L	40 g/L	60 g/L	80 g/L	100 g/L
$X_{máx}$ (g/L)	0,26 ± 0,03	3,32 ± 0,05	2,39 ± 0,05	8,11 ± 0,05	10,05 ± 0,18	5,91 ± 0,23
$P_{X,máx}$ ((g/L)/d)	0,00 ± 0,01	0,23 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,20 ± 0,05
$t_d$ (d)	0,00 ± 0,39	1,67 ± 0,06	2,76 ± 0,07	1,95 ± 0,36	3,09 ± 0,59	7,37 ± 0,17
$\mu$ ( $d^{-1}$ )	0,00 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,36 ± 0,00	0,23 ± 0,03	0,09 ± 0,00

A concentração para a qual se obteve um  $\mu$  superior e um  $t_d$  menor (Tabela 4.4), foi 20 g/L, o que está coerente com as curvas da Figura 4.32. No entanto, não foi a concentração para a qual se registou a maior  $P_{X,máx}$  ((g/L)/d). Contudo, é necessário ter em conta a provável contribuição do melão nas determinações de peso seco, aquando do traçar das rectas de calibração para as amostras com concentrações em açúcares totais superiores (também verificado para os ensaios com *S. obliquus*), o que também justifica os maiores valores de  $X_{máx}$  (g/L) obtidos para as concentrações de 60 g/L e 80 g/L de açúcares totais, às quais correspondem (juntamente com o crescimento a 100 g/L) as menores densidades celulares. Isto é suportado pelo estudo desenvolvido por Tanaka et al. (1994), no qual concluíram que durante a filtração as partículas do melão são depositadas e retidas na membrana, como num "dead-end", interferindo na filtração (sendo, inclusivamente, responsável pela diminuição do fluxo de filtrado). Consequentemente, vai interferir na pesagem do filtro, motivo pelo qual se optou por dar especial atenção aos valores de DO face aos valores de  $X$  (g/L) determinados a partir das curvas de calibração traçadas. Conclui-se que as células deveriam ter sido sujeitas a sucessivas lavagens (a fim de eliminar o melão) antes de serem filtradas para determinação do peso seco.

Na Figura 4.34 são apresentadas algumas imagens obtidas por microscopia no final do crescimento.

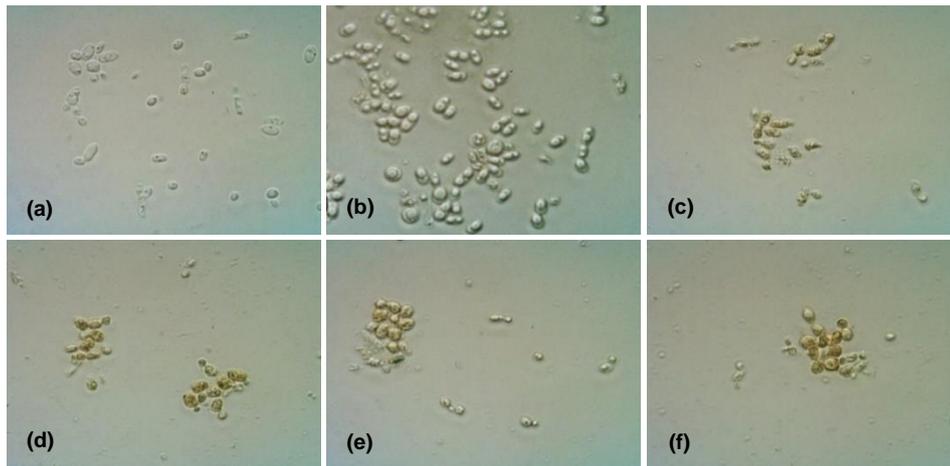


Figura 4.34: Imagens obtidas por microscopia óptica, com ampliação 1000x (lente de imersão), no último dia de ensaio: 10<sup>o</sup> dia para a cultura em crescimento em 20 g/L de açúcares totais (b); e 8<sup>o</sup> dia para as restantes culturas: (a) em efluente, (c) em 40 g/L, (d) em 60 g/L, (e) em 80 g/L e (f) em 100 g/L.

As maiores densidades celulares foram obtidas para o crescimento em 20 g/L de açúcares totais. As células de *R. toruloides*, uma vez na presença de concentrações de açúcares totais superiores a 20 g/L, tornaram-se menos arredondadas, mais amareladas e apresentam-se na forma de agregados celulares maiores, podendo esta alteração morfológica ser uma resposta de stress às elevadas concentrações de melaço. Esta resposta pode ser explicada pelos motivos anteriormente referidos, ou por limitações nutricionais que ocorrem frequentemente em culturas desenvolvidas em frascos agitados, justificando que para concentrações mais elevadas de açúcares totais no meio, as células apresentem níveis de stress mais elevados.

Foi realizada a contagem de células por citometria de fluxo (Figura 4.35).

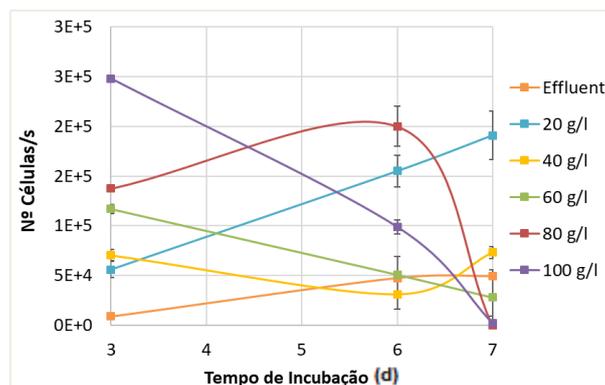


Figura 4.35: Contagem de células (em número de células/s) feita por citometria de fluxo, com diluição das amostras e dos brancos em tampão PBS, e com acerto a aproximadamente 1000 eventos/s para as amostras, durante os ensaios com *R. toruloides* em efluente e em efluente suplementado com 20-100 g/L de açúcares totais.

A maior densidade celular é verificada para o crescimento em 20 g/L de açúcares totais, a partir da qual, quanto maior a concentração de açúcares totais no meio, menor a densidade celular das culturas, confirmando que a concentração que mais favorece a produção de biomassa, de entre as estudadas, é 20 g/L. Além disso, é perceptível que para 20 g/L a densidade celular tem tendência a aumentar, enquanto que para concentrações superiores diminui com o tempo de crescimento, atingindo-se, no final dos ensaios, a 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, densidades celulares praticamente nulas.

A informação obtida da contagem de células, confirma as conclusões tiradas das curvas de  $DO_{600\text{ nm}}$  e das observações ao microscópio, o que corrobora a teoria de que o melado interferiu nas determinações de peso seco feitas, uma vez que os únicos valores não coerentes são os valores de  $X(g/L)$  determinados a partir das rectas de calibração (peso seco versus  $DO$ ).

Foi acompanhado, também por citometria de fluxo, o tamanho e complexidade das células de *R. toruloides*, dados pelos sinais em FSC e SSC, respectivamente (Figura 4.36).

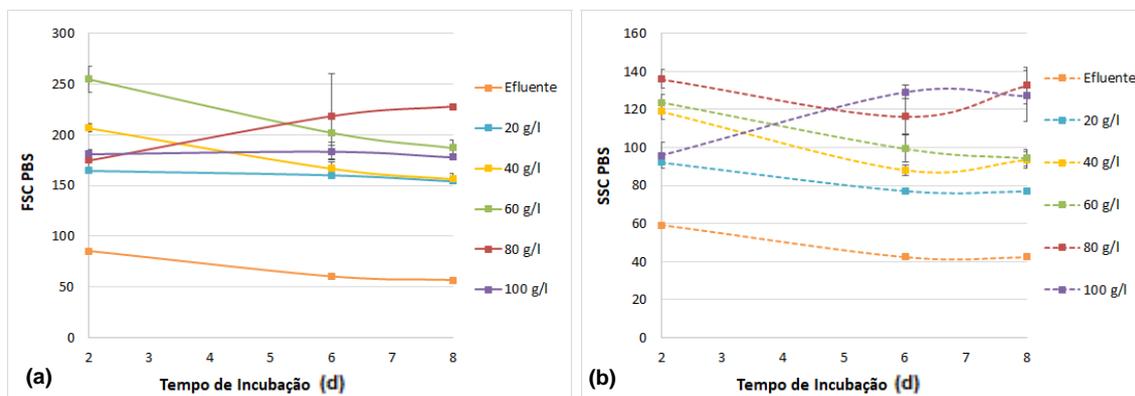


Figura 4.36: Curvas traçadas com base em informação obtida por citometria de fluxo para os ensaios apenas em efluente e em efluente suplementado com 20-100 g/L de açúcares totais. As amostras foram diluídas em tampão PBS, de forma a acertar, aproximadamente, a 1000 eventos/s, e as leituras são correspondentes à autofluorescência das amostras. (a) Sinal em FSC, indicativo do tamanho celular, e (b) sinal em SSC, indicativo da complexidade celular, em função do tempo de incubação.

Quanto maior a concentração em açúcares totais no meio, maiores os sinais de FSC e SSC emitidos pela população de *R. toruloides*, o que é justificado pela presença de maiores agregados celulares para estas concentrações, uma vez que os agregados celulares emitem valores elevados dos sinais de FSC e SSC (Figura 4.36).

Foi feita a análise aos ácidos gordos para cada um dos crescimentos deste ensaio, estando os resultados obtidos apresentados na Figura 4.37.

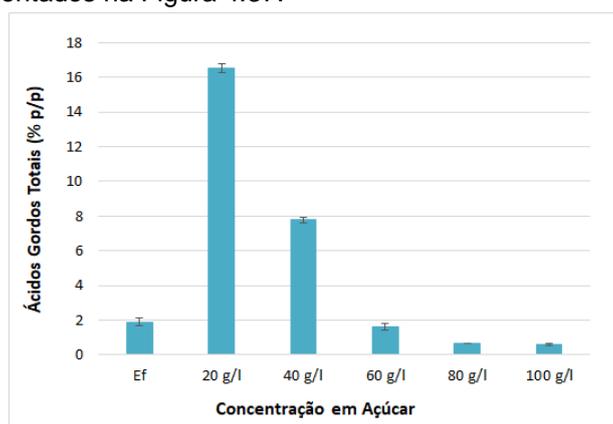


Figura 4.37: Resultado da análise aos ácidos gordos, para cada concentração, feita no último dia de ensaio.

A concentração que assegura a maior produção de ácidos gordos é 20 g/L (16,5% (p/p)), sugerindo que para esta concentração é significativa a assimilação do C disponível para síntese lipídica. De facto, Freitas et al., (2014a) reportaram que, para esta mesma estirpe de levedura, a acumulação dos triglicéridos acompanha a evolução da produção da biomassa, concluindo que a síntese destes

compostos está associada ao crescimento celular. Assim sendo, era espectável que a acumulação de ácidos gordos tenha sido superior para os ensaios com maior produção de biomassa. Comparando estes resultados com os obtidos com *S. obliquus* (Figura 4.16), verifica-se que a produção de ácidos gordos é substancialmente superior em *R. toruloides*. Comparando com os valores obtidos por Freitas et al., (2014b), em meio de cultura suplementado com xarope de alfarroba, percebe-se que a produção de ácidos gordos é equivalente (obtiveram, aproximadamente, 17,0% (*p/p*)). No entanto, verifica-se ser bastante inferior aos valores obtidos por Ling et al., (2013) (30,1% (*p/p*)), com crescimento em efluente de destilaria sem suplementação com melaço de cana-de-açúcar, o que corrobora a teoria de que a presença de melaço de cana-de-açúcar inibe a produção de biomassa e de lípidos pelas leveduras, tal como foi reportado por Taskin et al., (2016). Foi ainda inferior à obtida por Freitas et al., (2014a) com crescimento em meio de cultura definido ao crescimento de leveduras (33,0% (*p/p*)) também em frascos agitados. Contudo, apesar da menor produção de ácidos gordos, esta é conseguida com custos de meio de cultura praticamente nulos (apenas efluente e melaço), o que é uma grande vantagem do processo.

Os crescimentos foram acompanhados por leitura diária do pH (Figura 4.38). Este factor manteve-se aproximadamente constante em todos os crescimentos excepto em efluente e em 20 g/L de açúcares totais, provavelmente porque o efluente suplementado com melaço de cana-de-açúcar a > 20 g/L de açúcares totais, formam um meio tamponado. Para os crescimentos apenas em efluente e em 20 g/L de açúcares totais, o pH do meio aumenta. No entanto, era de esperar que este diminuísse, pois segundo Dias et al., (2016), do trabalho que desenvolveram com a levedura *R. toruloides*, também em frascos agitados, a 30°C e a 150 rpm, concluíram que o crescimento desta tem associado uma diminuição do pH do meio.

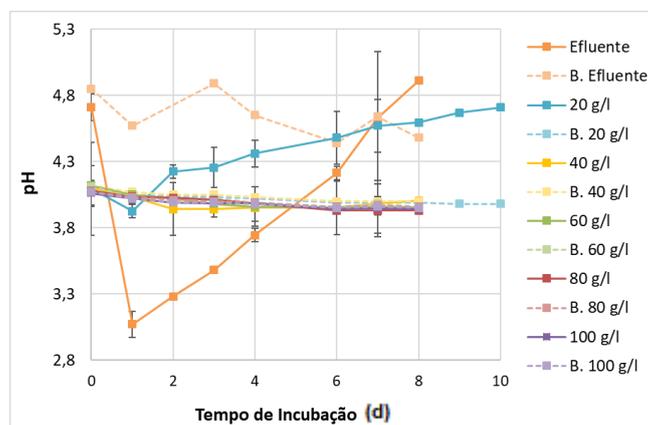


Figura 4.38: Curvas de pH, para cada crescimento, em função do tempo de incubação. O pH de cada meio foi acertado a 4,0 antes de esterilização. B. corresponde ao branco de cada amostra.

#### 4.5.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais na Actividade Enzimática e na Integridade Membranar

As maiores percentagens de células com actividade enzimática, foram observadas para os crescimentos da levedura apenas em efluente e a 20 g/L de açúcares totais (Figura 4.39(a)). A maior proporção de células com actividade enzimática no crescimento em 20 g/L é coerente com a maior produção de biomassa e de ácidos gordos registada nesta cultura, o que revela que as células se terão

desenvolvido em condições que favoreciam o crescimento celular. Por outro lado, para o crescimento em efluente, existe a contradição dos resultados obtidos com a CFDA e com o SytoxGreen (Figura 4.39(b)), provavelmente em consequência da falta de *C* e de *N* no efluente, que terá induzido danos na membrana das células (o que explica a elevada percentagem de células coradas com SytoxGreen). No entanto, as células preservaram a sua actividade enzimática em termos das esterases (uma vez que a CFDA detecta a actividade das enzimas esterases, associadas à actividade metabólica). Para os crescimentos em concentrações superiores a 20 g/L de açúcares totais, as reduzidas percentagens de células coradas com CFDA (inferiores a 50%), reveladoras de baixas actividades enzimáticas, estão em concordância com as menores taxas de crescimento e de produção lipídica verificadas para estas concentrações.

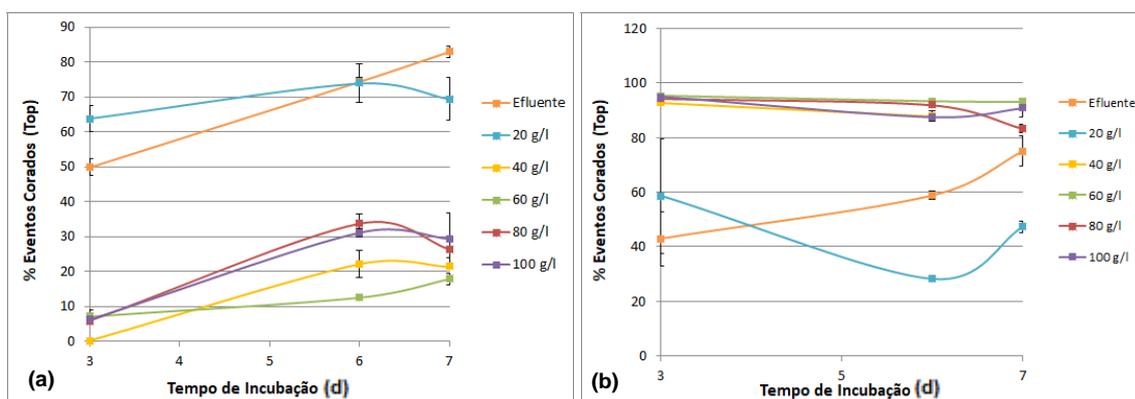


Figura 4.39: Actividade enzimática e integridade da membrana da levedura *R. toruloides* durante o ensaio apenas em efluente e em efluente suplementado com 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, e para um volume final de 500  $\mu$ L e aproximadamente 1000 eventos/s. (a) A diluição das amostras foi feita com tampão McIlvain e a incubação feita com 20  $\mu$ L de corante CFDA 10 mg/mL, no escuro, durante 50 min. (b) A diluição foi feita com tampão PBS e a incubação feita com 5  $\mu$ L de corante SytoxGreen 30  $\mu$ M, no escuro, durante 20 min.

A informação obtida pela análise com SytoxGreen (Figura 4.39(b)) é coerente com as conclusões feitas da análise com CFDA. Percebe-se que a concentração para a qual a proporção de células com membrana permeabilizada é menor (47,4%), é 20 g/L, e que para os crescimentos em concentrações superiores de açúcares totais, se registam percentagens de células coradas com SytoxGreen muito superiores (acima de 75,0%). Corroborando as teorias de inibição/limitação do crescimento de *R. obliquus* para concentrações de melação mais elevadas, fazendo com que as células apresentem níveis de stresse superiores, resultando num aumento da fragilidade membranar e, conseqüentemente, na percentagem de células coradas com SytoxGreen.

### 4.5.3. Efeito da Concentração dos Açúcares Totais no Tratamento

#### 4.5.3.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)

Na Figura 4.40 são apresentados os resultados da análise ao CQO para os tempos inicial e final do ensaio (a), bem como as respectivas *ER* (b), para as amostras e respectivos brancos.

O único crescimento para o qual se verificou remoção da carga de CQO do meio, foi em 20 g/L de açúcares totais, com uma *ER* de 30,2%. O aumento de CQO verificado para todos os outros crescimentos, poderá ter resultado do reduzido metabolismo celular (em consequência de qualquer uma das causas já referidas), das elevadas taxas de lise celular, e/ou de fenómenos de evaporação.

No trabalho que desenvolveram com *R. toruloides* em efluente de uma destilaria, também em frascos agitados, mas sem suplementação com melaço de cana-de-açúcar, Ling et al. (2013) obtiveram uma ER de CQO de 62,5%, aproximadamente o dobro do obtido neste trabalho, o que corrobora a teoria de que a levedura quando cresce na presença de melaço de cana-de-açúcar se encontra sob condições de inibição/limitação. Além disso, as elevadas acumulações de CQO neste ensaio, revelam que as taxas de evaporação neste trabalho foram, provavelmente, realmente significativas e determinantes.

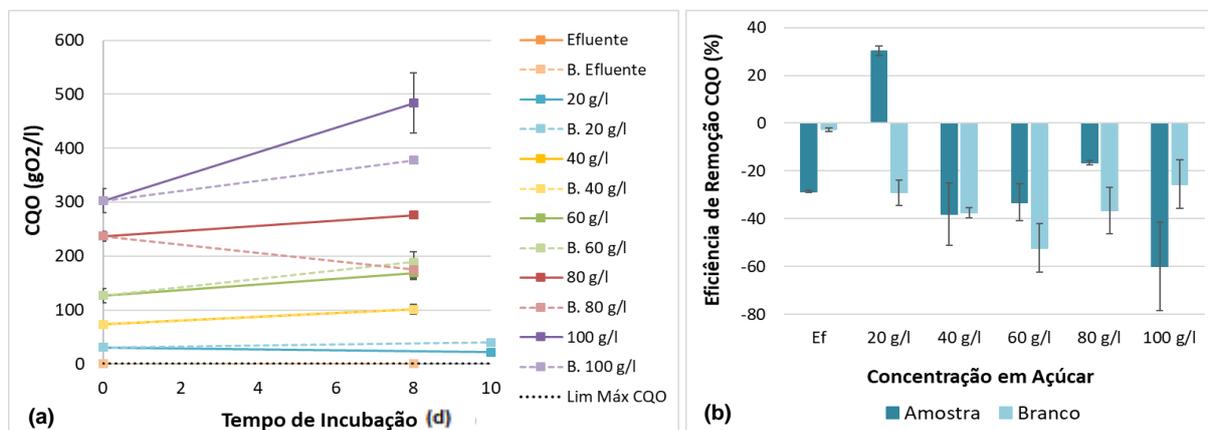


Figura 4.40: (a) Carência química de oxigênio (CQO) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios apenas em efluente e em efluente suplementado com 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, para as amostras e respectivos brancos, com o limite máximo de CQO legalmente exigido para descarga do efluente tratado e (b) ER de CQO, para cada amostra e respectivo branco. B. corresponde ao branco de cada amostra.

#### 4.5.3.2. Nitrogénio Amoniacal

A Figura 4.41 mostra os perfis da concentração residual de  $N - NH_3$  durante o desenvolvimento das culturas de *R. toruloides* em efluente e efluente suplementado com melaço a concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais (a), bem como as respectivas ER (b).

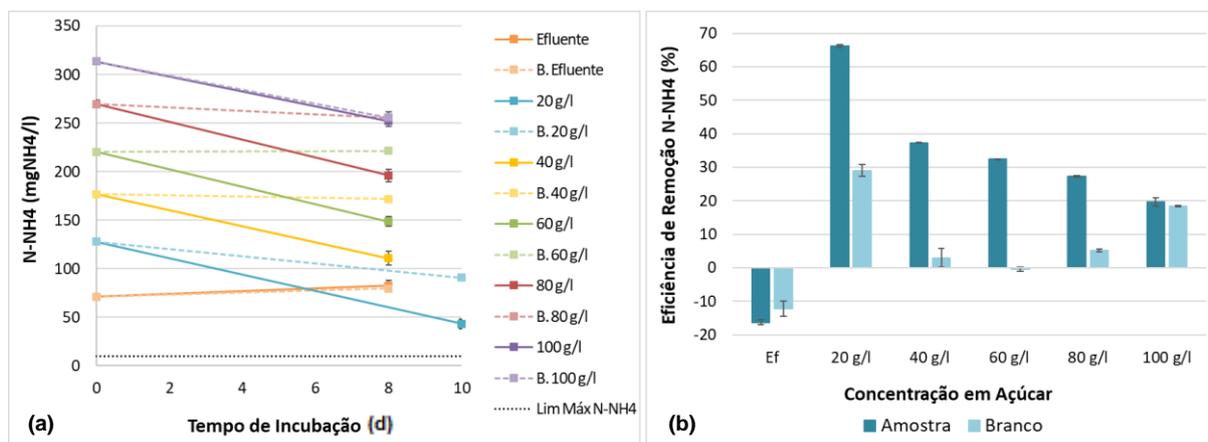


Figura 4.41: (a) Concentração de nitrogénio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios de *R. toruloides* desenvolvidos em efluente e em efluente suplementado com 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais e correspondentes brancos (B.), e respectivas (b) ER (%).

É também para o crescimento em 20 g/L que se verifica a maior ER do  $N - NH_3$  (ER = 66,2%), e para a qual a concentração final deste (43,2 gNH<sub>3</sub>/L) se aproxima mais do limite máximo legalmente exigido à descarga do efluente tratado (10,0 gNH<sub>3</sub>/L), compensando, inclusivamente, o aumento da carga inicial deste contaminante em resultado da suplementação com melaço. Por outro lado, com o aumento da concentração de açúcares totais no meio, e com a correspondente diminuição da produção de

biomassa e de ácidos gordos, há uma diminuição do consumo de  $N - NH_3$  e, conseqüentemente, das  $ER$  deste contaminante. Ebeling et al. (2006), referem que o  $N - NH_3$  pode ser usado pelas células em heterotrofia como fonte de  $N$ , para incorporação na biomassa celular e para síntese proteica, o que justifica o facto deste consumo ser superior para as concentrações com maiores produções de biomassa e lipídicas, ou seja, a 20 g/L.

Para o crescimento apenas em efluente há um aumento da carga de  $N - NH_3$ , o que é coerente com o comentado para as restantes concentrações, uma vez que no ensaio apenas em efluente não houve produção de biomassa (Tabela 4.4) e, conseqüentemente houve ausência de consumo deste contaminante; por outro lado, os fenómenos de evaporação contribuirão para o aumento das concentrações dos solutos presentes no meio de cultura.

Os consumos de  $N - NH_3$  nos brancos pode ser, tal como já foi referido acima, devido à perda deste sob a forma de  $NH_3(g)$ .

### 4.5.3.3. Fósforo

A Figura 4.42 mostra os resultados obtidos da análise ao  $P$ , para os tempos inicial e final dos ensaios feitos com culturas puras de *R. toruloides* em efluente e efluente suplementado com melão de cana-de-açúcar a concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, bem como as respectivas  $ER$ .

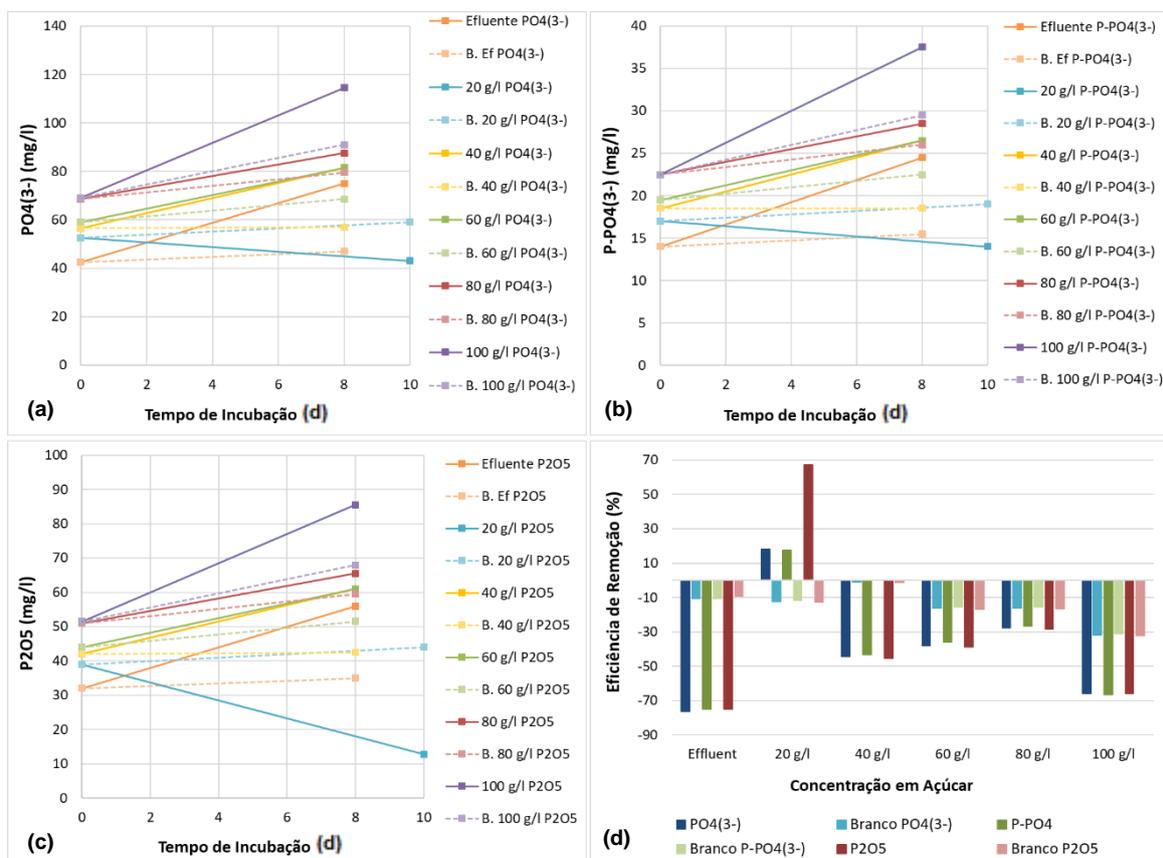


Figura 4.42: Concentração das três espécies de fósforo: (a)  $PO_4^{3-}$ , (b)  $P-PO_4^{3-}$  e (c)  $P_2O_5$ , para os tempos inicial e final dos ensaios feitos com *R. toruloides* em efluente e em efluente suplementado com 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, e correspondentes brancos (B.); e (d)  $ER$  (%).

Apenas houve remoção das três espécies de *P* analisadas para o crescimento em 20 g/L, com as seguintes *ER*:  $ER_{P_{O_4^{3-}}} = 18,1\%$ ,  $ER_{P_{-P_{O_4^{3-}}}} = 17,6\%$  e  $ER_{P_{2O_5}} = 67,2\%$ . O *P* é consumido pelas células para crescimento celular e produção de produtos lipídicos (Nicolau, 2014). É então coerente que as superiores remoções de *P* se tenham verificado para o ensaio no qual o crescimento, a actividade celular, e a produção de ácidos gordos tenham sido superiores. Para os restantes crescimentos não houve remoção de *P*, provavelmente em resultado das superiores taxas de morte celular (demonstrado através das elevadas percentagens de células coradas com SytoxGreen conforme mostrado na Figura 4.39(b)) e consequente libertação do *P* para o meio de cultura e, provavelmente, devido a fenómenos de evaporação, o que também justifica a acumulação de *P* nos brancos (embora não tão significativa como nas amostras).

#### 4.5.3.4. Remoção dos Açúcares Totais

Nas Figura 4.43 e 4.44 são apresentados, respectivamente, os resultados da análise dos açúcares totais para os ensaios com *R. toruloides* em efluente e efluente suplementado com melão a concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L de açúcares totais, e as respectivas *ER*.

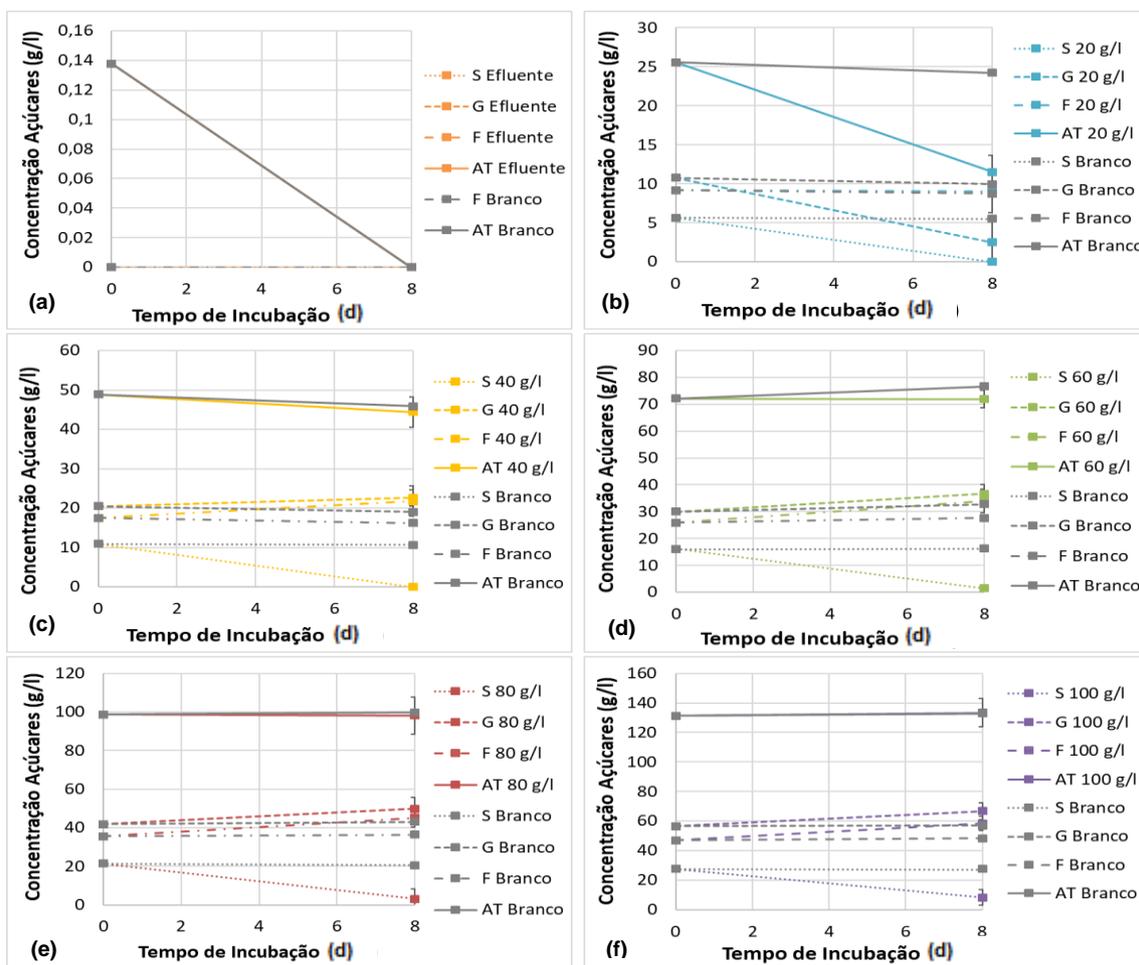


Figura 4.43: Concentração dos 3 açúcares principais: S-Sacarose; G-Glucose e F-Frutose, e ainda dos AT-Açúcares Totais, para os tempos inicial e final de ensaio, e para cada uma das concentrações estudadas. (a) Crescimento em efluente, (b) em 20 g/L e (c) em 40 g/L, (d) em 60 g/L, (e) em 80 g/L e (f) em 100 g/L. B. corresponde ao branco de cada amostra.

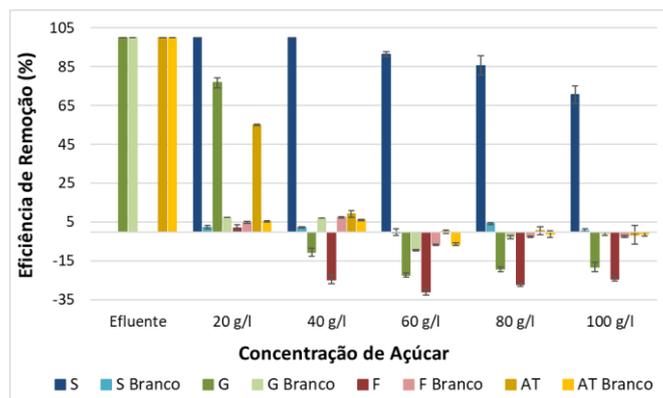


Figura 4.44: ER (%) dos três principais açúcares do melaço (S-sacarose, G-glucose e F-frutose) e dos açúcares totais (AT), para as amostras e para os correspondentes brancos.

Dos resultados da análise aos três principais açúcares existentes nas amostras (sacarose, glucose e frutose), apresentados na Figura 4.43 e, com base nas correspondentes *ER* calculadas (Figura 4.44), percebe-se que o único crescimento para o qual houve remoção dos três açúcares e, conseqüentemente, para o qual a *ER* dos açúcares totais foi positiva e significativa, foi 20 g/L:  $ER(S) = 100,0\%$ ;  $ER(G) = 76,7\%$ ;  $ER(F) = 2,1\%$ ;  $ER(AT) = 55,0\%$  (para o crescimento apenas em efluente a  $ER(AT)$  foi de 100%, no entanto foi desprezível, uma vez que este inicialmente apenas continha glucose e numa concentração praticamente nula, 0,14 g/L).

O consumo de açúcares totais para concentrações de açúcares totais no meio superiores a 20 g/L foi praticamente nulo, tendo-se observado que a sacarose (dissacárido) se decompôs em glucose e frutose (monossacáridos). De facto, Freitas et al. (2014b) reportaram que a levedura *R. toruloides* NCYC 921 tem capacidade para hidrolisar a sacarose em glucose e frutose. O mesmo terá ocorrido no ensaio a 20 g/L de açúcares totais, mas enquanto que nos ensaios a concentrações superiores de açúcares totais, a glucose e a frutose não foram consumidas durante o tempo de duração do ensaio, no crescimento a 20 g/L, estes açúcares foram consumidos. Estes resultados são coerentes com os obtidos da análise ao CQO (Figura 4.40). Os consumos de açúcares verificados para alguns dos ensaios em branco, podem ser o resultado da degradação espontânea dos açúcares do melaço, conforme o estudo feito por Browne (1929).

Comparando os baixos consumos de açúcares obtidos neste trabalho com os do projecto desenvolvido por Coelho (2015) com *R. toruloides* em meio de cultura definido à levedura e suplementado com glucose (35 g/L), com o qual conseguiu que ao fim de 19,7 h a glucose tivesse sido completamente consumida, verifica-se mais uma vez a inibição do crescimento de *R. toruloides* na presença de efluente e melaço de cana-de-açúcar. Ainda assim, as menores *ER* poderiam ser compensadas pelos menores custos associados à utilização de fontes de carbono baratas, o que teria de ser avaliado através de uma análise da sustentabilidade ambiental e económica de todo o processo.

#### 4.5.4. Resumindo

De entre as concentrações de açúcares totais utilizadas no crescimento da levedura *R. toruloides* em efluente e efluente suplementado com melaço, a que possibilitou a produção mais elevada de produtos lipídicos e o tratamento mais eficaz do efluente (ainda assim insuficiente), foi o ensaio a 20 g/L de

açúcares totais. Conclui-se, que a concentração óptima de açúcares totais para o crescimento da levedura em efluente secundário de indústria cervejeira suplementado com melaço de cana-de-açúcar, é 20 g/L de açúcares totais, para as condições operatórias definidas (150 rpm, 30°C e com luz).

## 4.6. Crescimento da Cultura Mista de *S. obliquus* e *R. toruloides* em Efluente Suplementado com Melaço de Cana-de-Açúcar

### 4.6.1. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Crescimento

O crescimento da cultura mista foi estudado apenas em efluente e nas seguintes concentrações de açúcares totais: 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L. O crescimento foi seguido até ao 9º dia de incubação, ao fim do qual se atingiu o patamar correspondente à fase estacionária, com excepção do crescimento em 60 g/L que contaminou ao 7º dia de ensaio, após o qual deixou de ser acompanhado.

Este ensaio não foi seguido por citometria de fluxo, pelo que não foram feitas as análises de actividade enzimática nem de integridade membranar, tendo sido feita, somente, a contagem de células.

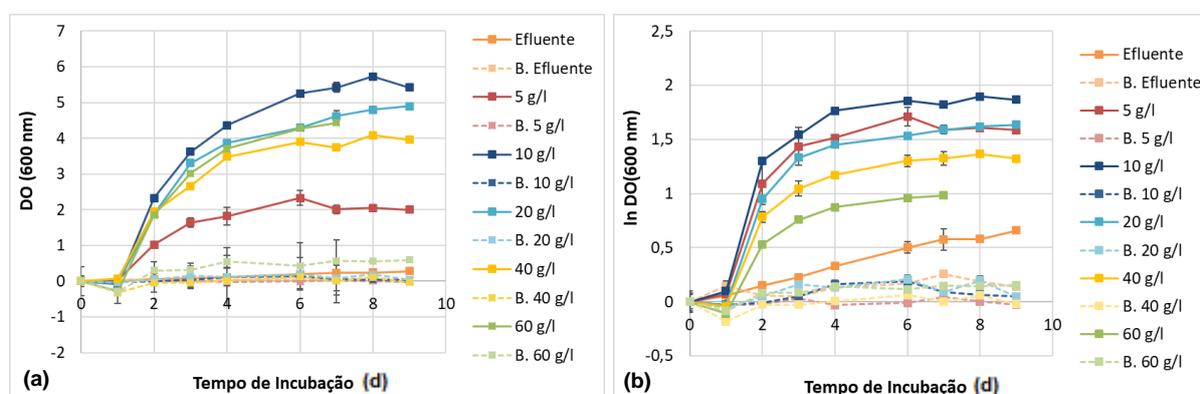


Figura 4.45: Curvas normalizadas, de forma a eliminar a interferência do melaço, de variação de (a) DO(600 nm) e (b) ln DO(600nm), durante o tempo de crescimento, nas condições de ensaio (pH inicial 6,0; 30°C e 150 rpm) e para cada crescimento: apenas em efluente, em 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L e respectivos brancos (B.).

Tabela 4.5: Valores de tempo de duplicação,  $t_d$ , e de taxa específica de crescimento máxima,  $\mu$ , para cada concentração de açúcar testada.

	Efluente	5 g/L	10 g/L	20 g/L	40 g/L	60 g/L
$t_d$ (d)	7,81 ± 0,95	0,68 ± 0,02	0,58 ± 0,05	0,71 ± 0,01	0,84 ± 0,07	1,09 ± 0,01
$\mu$ (d <sup>-1</sup> )	0,09 ± 0,01	1,02 ± 0,02	1,20 ± 0,07	0,98 ± 0,01	0,83 ± 0,05	0,64 ± 0,01

Das curvas de  $DO_{600\text{ nm}}$  obtidas por leitura diária (Figura 4.45), conclui-se que a concentração de açúcar no meio para a qual se consegue valores de  $X_{m\acute{a}x}(DO_{600\text{ nm}})$  e de  $\mu$  maiores, é 10 g/L. É também com 10 g/L de açúcares totais no meio que se assegura o crescimento da cultura com menor  $t_d$ .

As culturas foram acompanhadas por observação ao microscópio óptico, de onde se foi percebendo que as concentrações de açúcares totais no meio, para as quais a densidade celular era maior, foram 5 g/L e 10 g/L, tendo sido também para estas concentrações que se verificou a presença de maiores aglomerados celulares com população mista (visíveis a olho nu), demonstrando serem estas as concentrações de açúcares totais que asseguraram uma relação simbiótica entre *S. obliquus* e *R. toruloides* mais notória (muito provavelmente porque a microalga ter-se-á desenvolvido em autotrofia).

A Figura 4.46, mostra as fotografias obtidas por microscopia óptica ao 6º dia de ensaio. Embora não se possa retirar daqui qualquer fundamento quantitativo em resultado da aleatória distribuição das células na lâmina do microscópio, observa-se a presença destes agregados para os crescimentos em 5 g/L e 10 g/L de açúcares totais. Para 60 g/L, a população da microalga *S. obliquus* é praticamente inexistente. Pelos ensaios anteriores, feitos com culturas puras dos dois microrganismos, estes resultados já eram espectáveis, uma vez que para concentrações de açúcares totais no meio superiores a 20 g/L, ambas as culturas puras apresentavam valores de  $DO$  e  $\mu$  inferiores, e de  $t_d$  superiores, aos obtidos para esta concentração de açúcares totais.

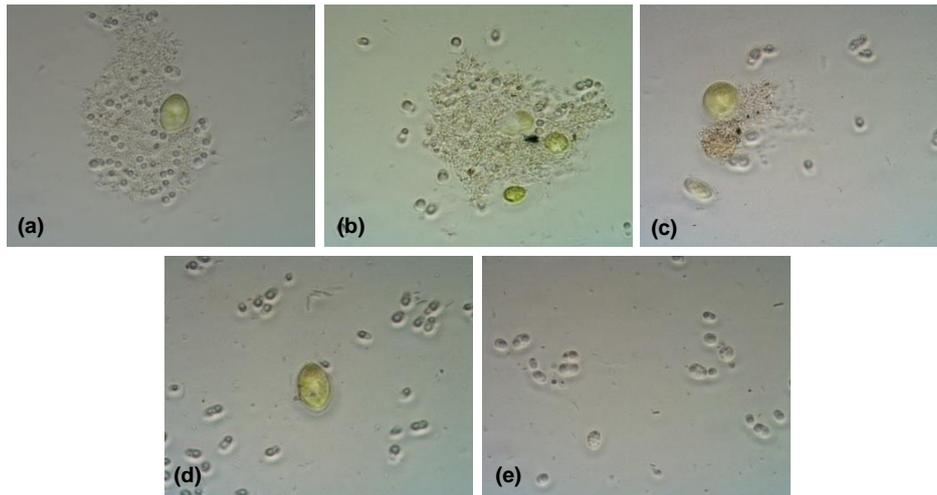


Figura 4.46: Fotografias obtidas por microscopia óptica, com ampliação 1000x (lente de imersão), no 6º dia de ensaio para os crescimentos em: (a) 5 g/L; (b) 10 g/L; (c) 20 g/L; (d) 40 g/L e (e) 60 g/L.

Foi feita a contagem do número de células/s para cada uma das culturas, por citometria de fluxo, estando as curvas obtidas apresentadas na Figura 4.47.

Este ensaio foi efectuado com o objectivo de escolher a concentração de açúcares totais no meio que é, efectivamente, mais propícia ao crescimento da cultura mista de *S. obliquus* e *R. toruloides*. Como tal, é importante que essa concentração assegure não só o tratamento do efluente, como a maior produção de biomassa e lípidos possível, preferencialmente sem que haja dominância de uma espécie sobre a outra, de forma a que a relação simbiótica seja viável. Assim, a contagem do número de células de cada uma das populações, forneceu informações muito importantes.

Da Figura 4.47, percebe-se que as concentrações para as quais se consegue assegurar o crescimento de *S. obliquus*, são: apenas em efluente, que não é opção uma vez que não é propício ao crescimento da levedura, como foi visto no Capítulo 4.5; em 5 g/L; e em 10 g/L de açúcares totais no meio. As concentrações de 40 g/L e 60 g/L de açúcares totais não asseguram o crescimento da microalga *S. obliquus*, como também já tinha sido concluído no Capítulo 4.4, e para 20 g/L de açúcares totais, há crescimento de *S. obliquus*, no entanto há nitidamente domínio da população de *R. toruloides*.

Quanto ao crescimento de *R. toruloides*: a concentração de açúcares totais no meio mais propícia é 20 g/L, o que é consistente com os resultados descritos no Capítulo 4.5; seguida das concentrações de 40 g/L, que como já foi referido não é opção ao crescimento da cultura mista em virtude de não assegurar o crescimento de *S. obliquus*; e 10 g/L.

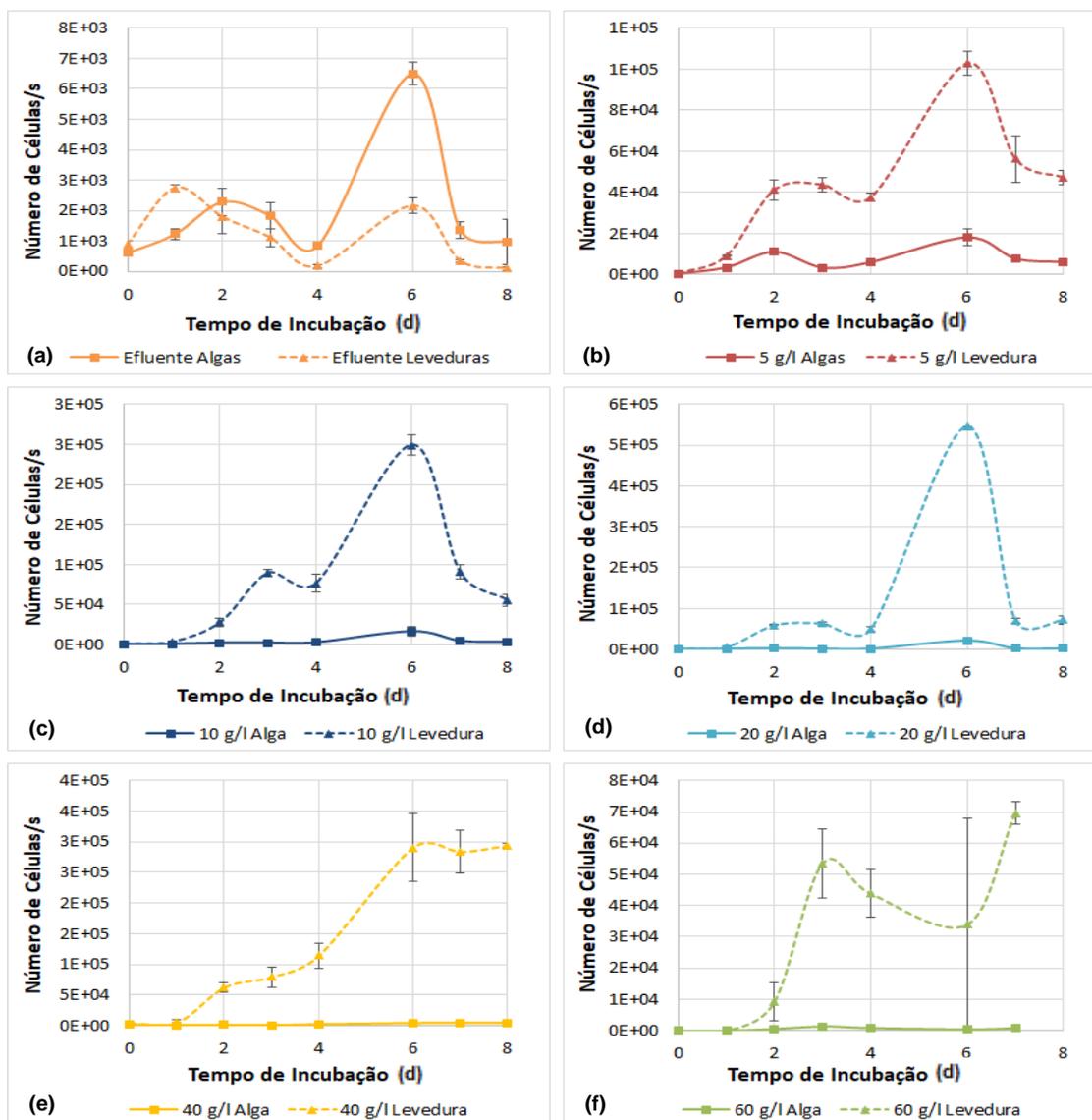


Figura 4.47: Contagem de células, de microalga (a contínuo) e de levedura (a tracejado), para os crescimentos em: (a) Efluente; (b) 5 g/L; (c) 10 g/L; (d) 20 g/L; (e) 40 g/L e (f) 60 g/L de açúcares totais no meio.

Assim sendo, com base na produção de biomassa e na relação de densidades celulares conseguida entre as duas populações, as únicas hipóteses de concentração de açúcares totais no meio a considerar para o tratamento biológico com cultura mista, são: 5 g/L, 10 g/L e 20 g/L. No entanto, associando os factos de 5 g/L comprometer o crescimento de *R. toruloides* (a biomassa de levedura que se consegue obter na concentração de 10 g/L, é cerca de 2,5 vezes superior à obtida em 5 g/L, o que favorece muito o processo em termos de produção de produtos lipídicos); de 20 g/L comprometer o crescimento de *S. obliquus*; e de 10 g/L ser a concentração que assegura um maior  $X_{máx}(DO_{600\text{ nm}})$  e  $\mu$ , e um menor  $t_d$ , 10 g/L parece ser a hipótese mais vantajosa. No entanto, é necessário que não só favoreça o desenvolvimento das populações, mas que assegure o tratamento do efluente e, idealmente, que também permita uma satisfatória produção de produtos lipídicos.

Foi feita a análise aos ácidos gordos, estando os resultados apresentados na Figura 4.48.

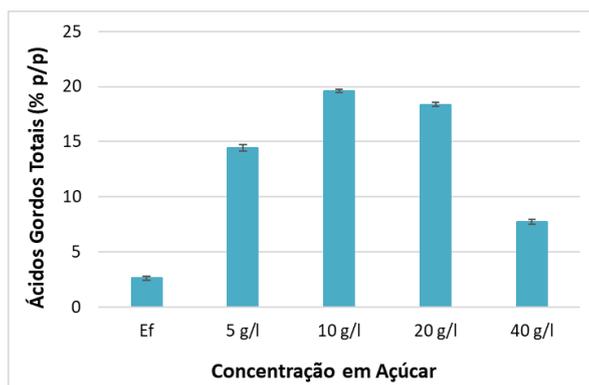


Figura 4.48: Teor em ácidos gordos da biomassa colhida no último dia de ensaio, para cada uma das concentrações de açúcar no meio.

A concentração de açúcares totais no meio de cultura que assegura a maior produção de lípidos pela cultura mista, é 10 g/L, tendo atingido um teor de 19,6%(p/p), sendo este facto uma vantagem adicional ao desenvolvimento da cultura mista a esta concentração. É de notar que a produção de ácidos gordos pela cultura mista a 10 g/L foi não só a que garantiu uma superior produção de produtos lipídicos de entre os vários crescimentos feitos com cultura mista, mas também de todos os crescimentos feitos com culturas puras, tendo correspondido ao maior teor em ácidos gordos obtido neste trabalho.

Os crescimentos foram seguidos também por leitura de pH (Figura 4.49) sendo que o pH dos meios foi ajustado a 6,0 (a fim de tentar o equilíbrio entre o pH óptimo à levedura: 4,0; e o pH óptimo à microalga: 7,0) antes de esterilização. Como tal, as discrepâncias de valores de pH iniciais são o resultado do processo de esterilização dos meios (efluente e melação, sendo que cada concentração foi esterilizada em separado) (Vacin & Went, 1949).

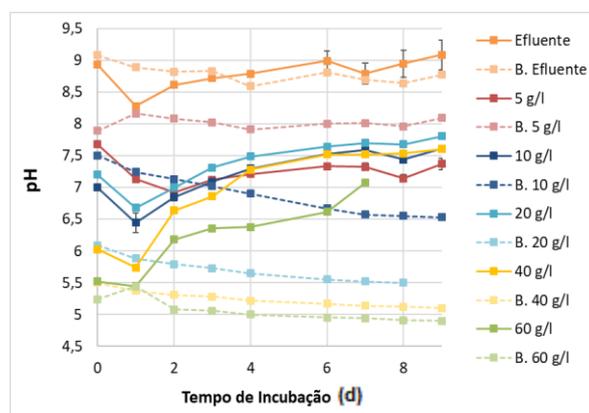


Figura 4.49: Curvas de pH, para cada crescimento, em função do tempo de incubação.

Para cada ensaio, o pH do meio tende a aumentar ligeiramente com o tempo de crescimento, o que não era de esperar, uma vez que, por um lado, a microalga muito provavelmente se desenvolveu em mixotrofia (consoante os resultados obtidos dos ensaios com culturas puras deste microrganismo), o que se viu ter associadas diminuições de pH; e, por outro lado, como também já foi referido, a levedura *R. toruloides* tem associado ao seu crescimento diminuições do pH do meio (Dias et al., 2016). Assim, era de esperar que o pH dos meios para os ensaios com cultura mista tivesse diminuído.

## 4.6.2. Efeito da Concentração de Açúcares Totais no Tratamento

### 4.6.2.1. Carência Química de Oxigênio (CQO)

Os únicos crescimentos das culturas mistas que possibilitaram remoção da carga de CQO, foram os efectuados apenas em efluente ( $ER_{Efluente} = 51,9\%$ ), e em 5 g/L e 10 g/L de açúcares totais ( $ER_{5\text{ g/L}} \approx ER_{10\text{ g/L}} \approx 37,6\%$ ).

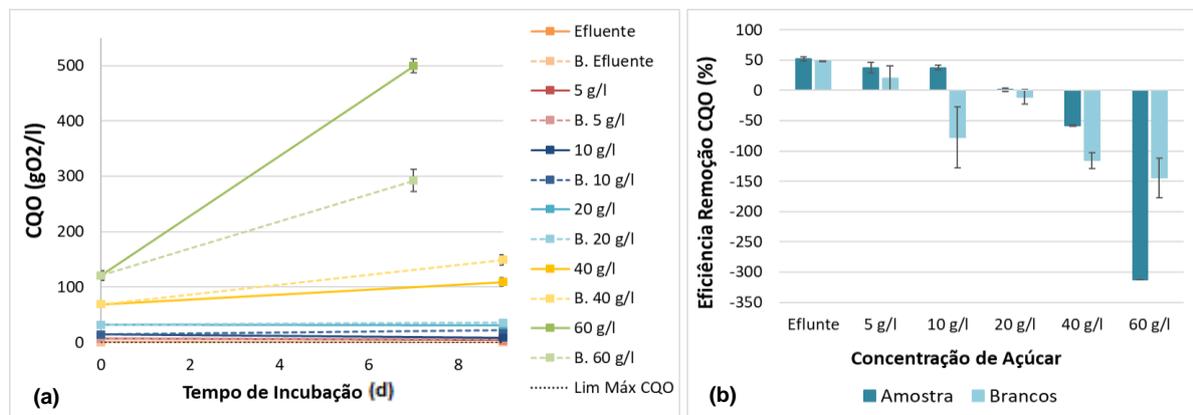


Figura 4.50: (a) Carência química de oxigênio (CQO) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios com cultura mista desenvolvida em apenas em efluente e em efluente suplementado com 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L, mostrando o limite máximo de CQO legalmente exigido para descarga do efluente tratado, e (b) ER de CQO dos meios, para cada uma das concentrações estudadas e respectivos brancos (B.).

Para as concentrações de 40 g/L e 60 g/L não se verifica qualquer remoção da carga orgânica do efluente, verificando-se acumulação de CQO (Figura 4.50), o que poderá estar associado à inibição dos dois microrganismos para estas concentrações, ou a limitações nutricionais (nomeadamente de  $N$  e  $O_2$ ), conforme foi analisado nos capítulos 4.4 e 4.5. Para a concentração de 20 g/L a carga orgânica também não é removida ( $ER \approx 0\%$ ).

O crescimento apenas em efluente ( $C_f = 0,17\text{ gO}_2/\text{L}$ ) foi o único que permitiu que o efluente no final do processo se aproximasse mais do legalmente exigido a um efluente tratado ( $0,15\text{ gO}_2/\text{L}$ ), em resultado da baixa carga orgânica inicial deste por se tratar de um efluente secundário, ou seja, já parcialmente tratado. No entanto, e tal como já foi visto, este meio não permite o desenvolvimento de *R. toruloides*. Em 5 g/L e 10 g/L, as concentrações finais de CQO não são muito elevadas ( $C_f = 4,42\text{ gO}_2/\text{L}$  e  $C_f = 8,83\text{ gO}_2/\text{L}$ , respectivamente), sendo, no entanto, superiores ao limite máximo permitido. O que revela que, à semelhança do tratamento com culturas puras de *S. obliquus* e *R. toruloides*, o tratamento biológico com cultura mista também não é eficaz na remoção da carga de CQO.

Ainda assim, é interessante reparar que as ER de CQO pela cultura mista são superiores às obtidas com cultura pura de *R. toruloides* (a maior ER obtida foi de 30,2%, em 20 g/L de açúcares totais).

### 4.6.2.2. Nitrogénio Amoniacal

Os crescimentos que asseguraram maiores ER e que permitiram que a concentração final de  $N - NH_3$  se aproxime mais do limite máximo legalmente exigido para descarga do efluente tratado ( $10,0\text{ mgNH}_4/\text{L}$ ), com excepção do crescimento apenas em efluente ( $C_f = 8,1\text{ mgNH}_4/\text{L}$ ), são os que foram realizados nas concentrações de açúcares totais de 5 g/L e 10 g/L ( $C_f = 13,7\text{ mgNH}_4/\text{L}$  e  $C_f = 22,2\text{ mgNH}_4/\text{L}$ , respectivamente), apresentando valores de ER de 78,6% e 70,6%, respectivamente,

como se pode ver pela Figura 4.51. Mais uma vez, o consumo de  $N - NH_3$  nos brancos poderá ser resultante da perda deste na forma de  $NH_3(g)$ .

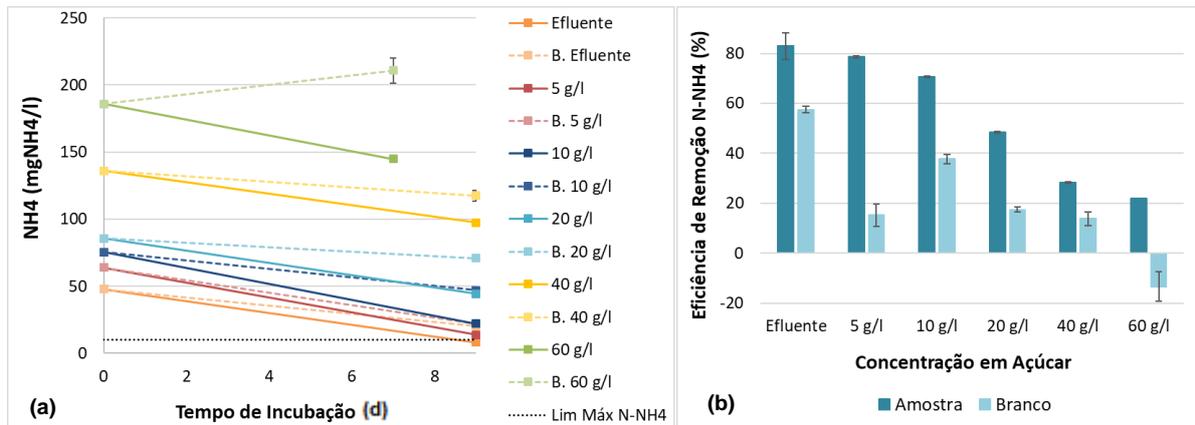


Figura 4.51: (a) Concentração de nitrogénio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) correspondente aos tempos inicial e final dos ensaios com cultura mista apenas em efluente e em efluente suplementado com 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L, e dos correspondentes brancos (B.); e respectivas (b) ER (%), para as amostras e brancos.

### 4.6.2.3. Fósforo

Da Figura 4.52, conclui-se que a concentração de açúcares totais que resulta na máxima ER para as três espécies de P ( $PO_4^{3-}$ ,  $P - PO_4^{3-}$  e  $P_2O_5$ ) é 10 g/l, tendo atingido as seguintes ER:  $ER_{PO_4^{3-}} = 74,7\%$ ,  $ER_{P-PO_4^{3-}} = 74,1\%$  e  $ER_{P_2O_5} = 74,2\%$ . Acresce ainda que esta concentração permite obter, no final do crescimento, menores concentrações destes contaminantes (ver Tabela 4.8).

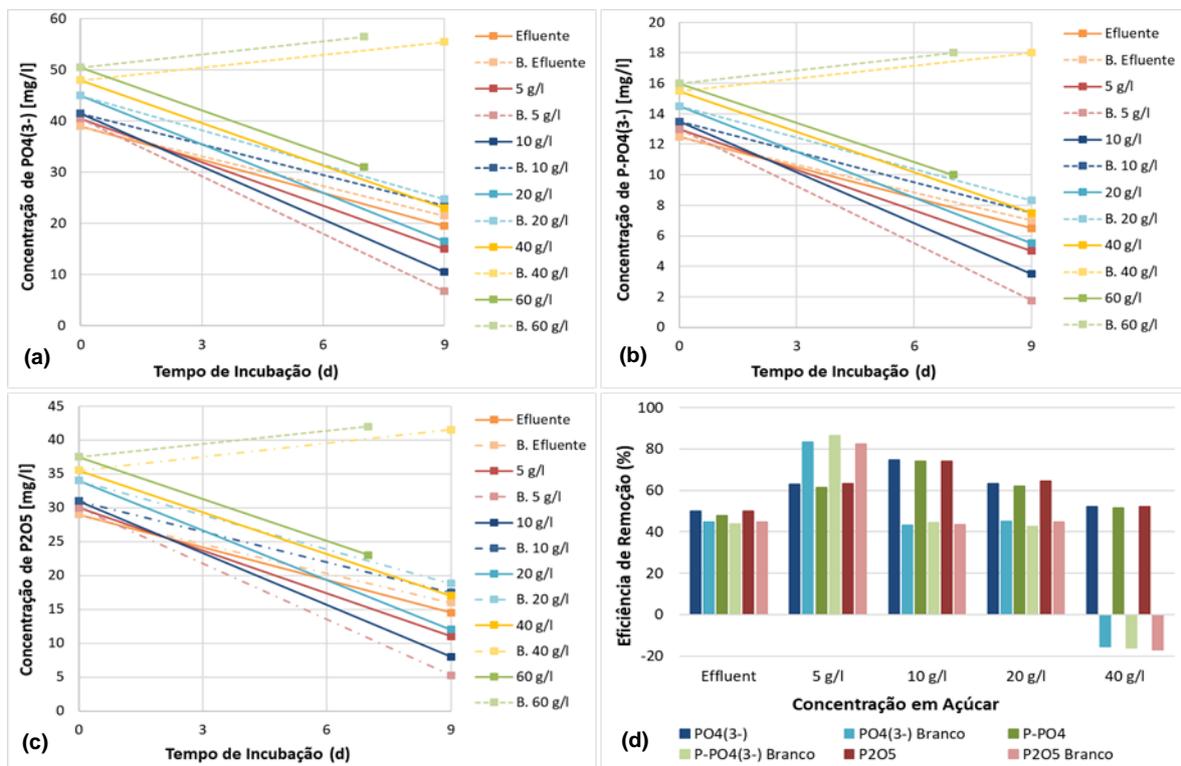


Figura 4.52: Concentração das três espécies de fósforo: (a)  $PO_4^{3-}$ , (b)  $P-PO_4^{3-}$  e (c)  $P_2O_5$ , para os tempos inicial e final dos ensaios com cultura mista apenas em efluente e em efluente suplementado com 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L e 60 g/L, e correspondentes (d) ER (%). B. corresponde aos brancos de cada amostra.

Por comparação destes resultados com os obtidos para as culturas puras de *S. obliquus* e *R. toruloides* nas mesmas condições (ver Tabela 4.7), é nítida a vantagem que existe na remoção de *P* pela cultura mista, talvez pela simbiose entre as duas espécies, que contribua para a redução da morte celular e para o aumento da produção de biomassa e de produtos lipídicos, que de facto é confirmado pelas curvas de DO (Figura 4.45) e da análise aos ácidos gordos (Figura 4.48), respectivamente.

#### 4.6.2.4. Remoção dos Açúcares Totais

Com excepção do crescimento apenas em efluente, para o qual a *ER* de açúcares totais é de 100,0% (sendo a concentração inicial destes praticamente nula), o crescimento em 5 g/L foi o que assegurou uma remoção de açúcares totais mais eficaz, tendo atingido um valor de *ER* de 72,9% (Figura 4.53). A *ER* para o crescimento em 10 g/L também foi satisfatória ( $ER(AT) = 54,8\%$ ) (Tabela 4.8).

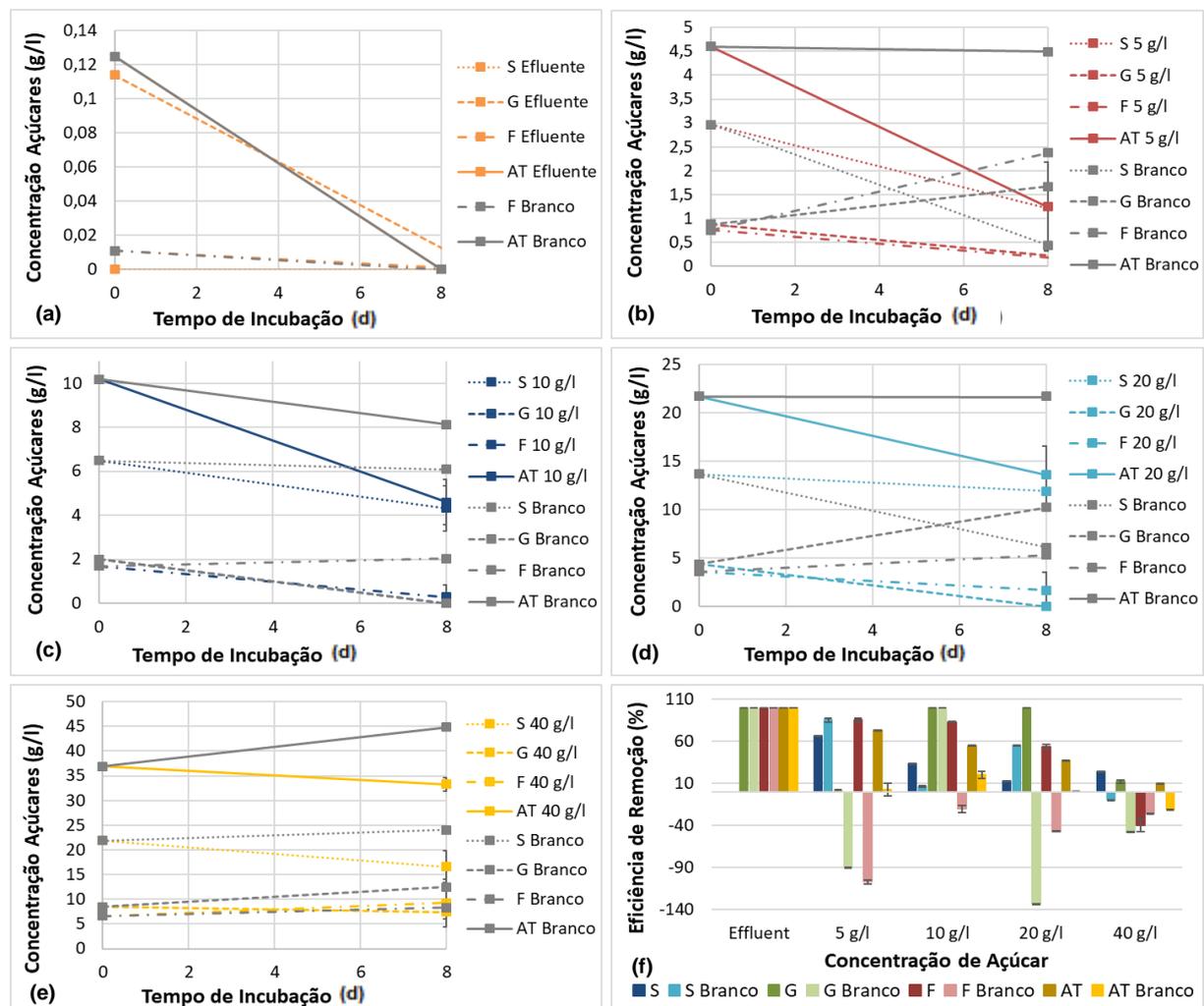


Figura 4.53: Concentração dos 3 açúcares principais: S-Sacarose; G-Glucose e F-Frutose, e ainda dos AT-Açúcares Totais, para os tempos inicial e final de ensaio, para cada crescimento e respectivo branco (B.): (a) em efluente, (b) em 5 g/L e (c) em 10 g/L, (d) em 20 g/L, (e) em 40 g/L. (f) Correspondentes *ER* das 3 espécies de açúcares, assim como dos açúcares totais, também para as amostras e respectivos brancos.

A concentração de açúcares totais no ensaio em branco a 40 g/L, aumentou no final do ensaio ( $ER = -21,5\%$ ), o que sugere a ocorrência de evaporação ao longo do mesmo. Observa-se ainda, que para a cultura mista conduzida à mesma concentração de açúcares totais (40 g/L), a *ER* atingiu os 9,9%, tendo sido o crescimento com menor *ER* de açúcares totais, sugerindo, uma vez mais, um mecanismo

de inibição pelos compostos tóxicos presentes no melão (Freitas et al., 2014b), ou por limitação de um nutriente que não o *C*, por exemplo o *N* (Taskin et al., 2016) ou o  $O_2$ , podendo ter ocorrido simultaneamente alguma evaporação.

Ao contrário do que foi verificado para os crescimentos com cultura pura de *R. toruloides*, para a cultura mista de *R. toruloides* e *S. obliquus* não houve hidrólise da sacarose em glucose e frutose ou, se houve, foi insignificante. Por outro lado, por comparação das *ER* das amostras e dos respectivos brancos, parece ter havido preferência pelo consumo de frutose, face à sacarose e glucose.

### 4.6.3. Resumindo

Tendo em conta a produção de biomassa, a simbiose entre *S. obliquus* e de *R. toruloides*, a produção de ácidos gordos e o tratamento do efluente, conclui-se que 10 g/L é a concentração de açúcar no meio mais favorável.

## 4.7. Crescimento da Cultura Mista de *S. obliquus* e *R. toruloides* em Efluente Suplementado com Melão de Cana-de-Açúcar: Esterilidade e Não Esterilidade

### 4.7.1. Efeito da Esterilidade no Crescimento

Os crescimentos, em condições de esterilidade e de não esterilidade, foram seguidos diariamente por leitura da  $DO_{600\text{ nm}}$  e do pH, utilizando a concentração de açúcares totais seleccionada nos ensaios anteriores (10 g/L), estando as curvas obtidas apresentadas na Figura 4.54. Os crescimentos foram seguidos até que fosse atingida a fase estacionária, ou seja, até ao 8º dia de incubação para a cultura em condições de esterilidade, e até ao 6º dia para a cultura em condições de não esterilidade.

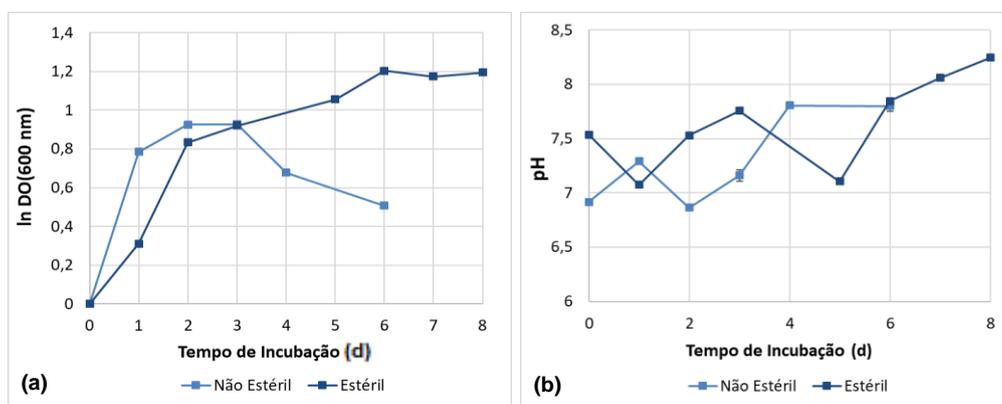


Figura 4.54: (a) Curvas de  $\ln DO_{600\text{ nm}}$  normalizadas, de forma a eliminar a interferência do melão de cana-de-açúcar, para condições de esterilidade e de não esterilidade. (b) Curvas de pH para o tempo de incubação, também para condições de esterilidade e de não esterilidade, partindo do pH inicial 6,0.

A cultura conduzida em condições de esterilidade atingiu valores de concentração de biomassa superiores (Figura 4.54(a)), comparando com a curva da  $DO_{600\text{ nm}}$  conduzida em condições de não esterilidade. Contudo, para condições de não esterilidade observou-se uma  $\mu$  maior e um menor  $t_d$ , como se pode ver pela Tabela 4.6. Percebe-se ainda que a cultura sob condições de não esterilidade atingiu a fase estacionária mais cedo ( $t = 1\text{ d}$ ), do que a cultura em condições de esterilidade, o que já era de esperar, uma vez que, tratando-se de um meio não estéril, a população microbiana é muito mais

densa e variada do que na cultura realizada em condições de esterilidade, por todos os microrganismos presentes no efluente, incluindo microrganismos de vários géneros, tais como as bactérias que se dividem mais rapidamente do que as leveduras e as microalgas. Tal facto explica que o consumo dos nutrientes tenha ocorrido muito mais rapidamente na cultura desenvolvida em condições não estéreis do que na cultura sob condições de esterilidade, como adiante se demonstrará.

Na curva de crescimento da cultura mista em condições de esterilidade (Figura 4.54(a)), percebe-se a existência de dois declives diferentes: o primeiro corresponde à fase exponencial sem limitações e o segundo, provavelmente, corresponde à continuação da fase exponencial embora sob condições de limitação, por exemplo, de  $N$  (Taskin et al., 2016) ou de  $O_2$  (Odds et al., 1995). Segundo um estudo desenvolvido por Schultz (1964), ensaios realizados em frascos agitados com rolhas de algodão, podem limitar significativamente a transferência de oxigénio, que associado à baixa solubilidade do oxigénio no meio, pode resultar na limitação do crescimento microbiano.

Tabela 4.6: Valores de  $t_d$  e  $\mu$ , para os crescimentos em condições de esterilidade e de não esterilidade.

	Esterilidade	Não Esterilidade
$t_d$ (d)	$1,33 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,01$
$\mu$ ( $d^{-1}$ )	$0,52 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,01$

Os crescimentos foram seguidos por observação ao microscópio óptico, com lente de imersão. Na Figura 4.55 estão imagens do 5º e do 8º dia de crescimento da cultura em esterilidade. Ao 8º dia de crescimento a população de *R. toruloides* parecia estar a diminuir, havendo uma redução da densidade celular, muito provavelmente em resultado da inibição do crescimento por limitação nutricional ou pela presença de inibidores de crescimento (como já foi referido); por outro lado, observou-se que a população de microalgas não só não estava afectada, como as células se tornaram maiores e mais verdes (razão pela qual o crescimento em esterilidade não foi interrompido ao 8º dia, o que será desenvolvido no Capítulo 4.8).

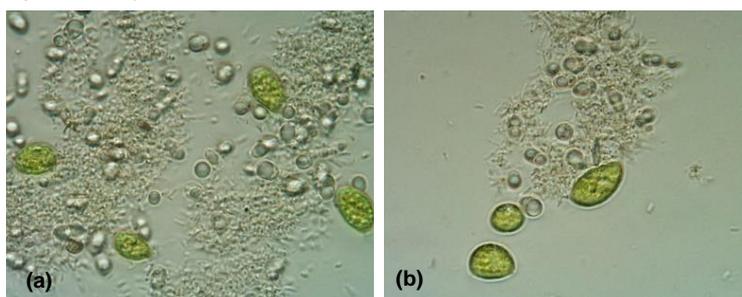


Figura 4.55: Imagens obtidas por microscopia óptica, com lente de imersão (1000x), nos (a) 5º e (b) 8º dias de crescimento da cultura em condições de esterilidade.

A cultura em condições de não esterilidade foi seguida diariamente por microscopia, a fim de monitorizar o desenvolvimento da população microbiana, bem como os crescimentos de *S. obliquus* e de *R. toruloides* nesta condição (Figura 4.56).

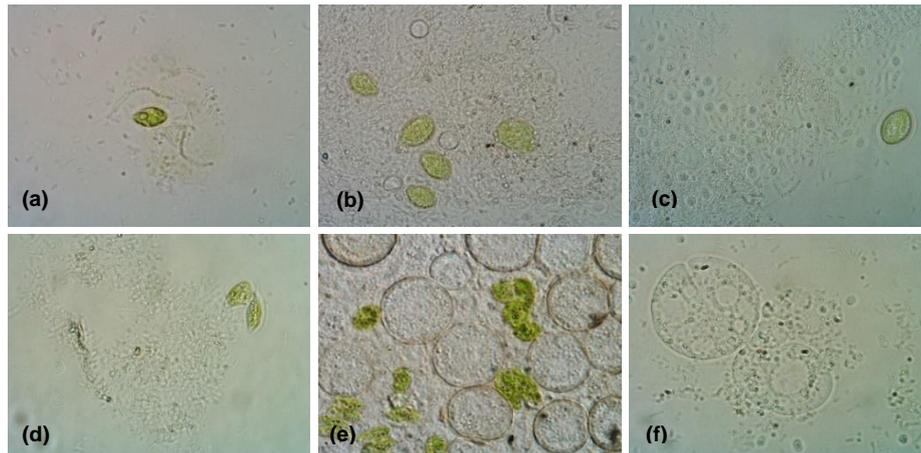


Figura 4.56: Imagens de Microscopia óptica, com lente de imersão (1000x), nos dias: (a) 1º; (b) 2º; (c) 3º; (d) 4º e (e) 6º de crescimento em condições de não esterilidade. (f) Contaminação, detectada ao 2º dia de crescimento.

Ao 2º dia de incubação, detectou-se o aparecimento de agregados celulares, com *S. obliquus* e *R. toruloides* (entre outros microrganismos), e a presença de um microrganismo eucariota de elevadas dimensões (Figura 4.56(f)), que fagocitava os microrganismos menores (visível ao microscópio), inclusive a levedura *R. toruloides*. A formação dos agregados celulares, correspondente a um típico comportamento de stresse celular, deve ter estado associada à presença destes contaminantes.

Do 4º para o 6º dia de incubação, a população de *R. toruloides* praticamente desapareceu e surgiu outra população de microrganismos que se supõe serem leveduras (células circulares, visíveis na Figura 4.56(e)), que formou grandes e densos agregados celulares com a população de *S. obliquus*. Com a formação dos agregados, a microalga cresceu significativamente, em número de células e em tamanho celular, além de se tornar muito mais verde, revelando a forte simbiose estabelecida entre este microrganismo, supostamente uma levedura, e a microalga *S. obliquus*, que parece ter-se desenvolvido nesta fase por metabolismo autotrófico, a avaliar pela coloração verde das células que revela altas composições em clorofila.

Concluiu-se, assim, que a cultura mista de *S. obliquus* e *R. toruloides* é mantida apenas em esterilidade.

Foi feita, diariamente, a análise aos ácidos gordos para ambos os ensaios, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.57.

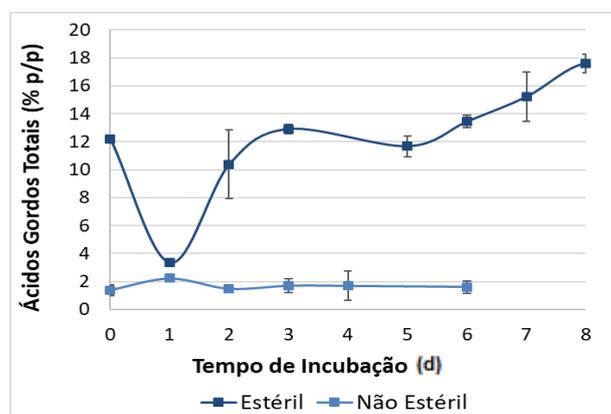


Figura 4.57: Teor de ácidos gordos para os ensaios das culturas mistas com 10 g/L de açúcares totais, em condições de esterilidade e em condições de não esterilidade.

Confirma-se que a produção de lípidos intracelulares é muito superior em condições de esterilidade (17,6% (*p/p*)) do que em não esterilidade (1,6% (*p/p*)), o que já era de esperar, em parte devido à superior capacidade das leveduras oleaginosas, e em particular *R. toruloides*, para produção de lípidos face a culturas de outros microrganismos (Qiang et al., 2008; Freitas et al., 2014a).

Os resultados de produção de lípidos pela cultura mista em condições de esterilidade são satisfatórios, tendo em conta que os mesmos foram obtidos em culturas descontínuas desenvolvidas em frascos agitados, onde se sabe que ocorrem limitações nutricionais, em particular pelo oxigénio (Freitas et al., 2014a). Segundo Zhu et al., (2012), *R. toruloides* é capaz de acumular lípidos intracelulares em teores superiores a 70% do seu peso seco, mas geralmente esses elevados teores de lípidos só são obtidos em biorreactores com sistema de controlo do pH da cultura e das taxas de agitação e de arejamento, o que evita que as células sejam expostas a pH baixos e/ou a condições de limitação nutricional, que baixam o rendimento do processo.

Hassan et al., (1996) reportaram que o aumento da razão *C/N* de 25 para 70 induziu o aumento do teor de óleo acumulado de 18% para 46% na levedura *Cryptococcus curvatus*. Para as condições de crescimento em efluente suplementado com melação de cana-de-açúcar a 10 g/L de açúcares totais, a razão *C/N* no arranque do crescimento foi de aproximadamente 4, em consequência da elevada carga de *N* no meio resultante da suplementação, o que poderá ter contribuído para que a produção lipídica pela cultura não tenha excedido os 18%. Assim, com base no estudo desenvolvido pelos referidos autores, a acumulação de 17,6% (*p/p*) em produtos lipídicos obtida foi bastante satisfatória. Tal como já foi referido acima, apesar da elevada carga em *N* do melação de cana-de-açúcar, este não garante o crescimento de leveduras, tendo, muito provavelmente, contribuído para a limitação nutricional e, segundo Rossi et al., (2011) a acumulação significativa de lípidos ocorre quando há limitação de um nutriente que não o *C*. Assim, a limitação por *N* pode estar na origem da satisfatória acumulação de ácidos gordos neste ensaio.

## 4.7.2. Efeito da Esterilidade no Tratamento do Efluente

### 4.7.2.1. Carência Química de Oxigénio (CQO)

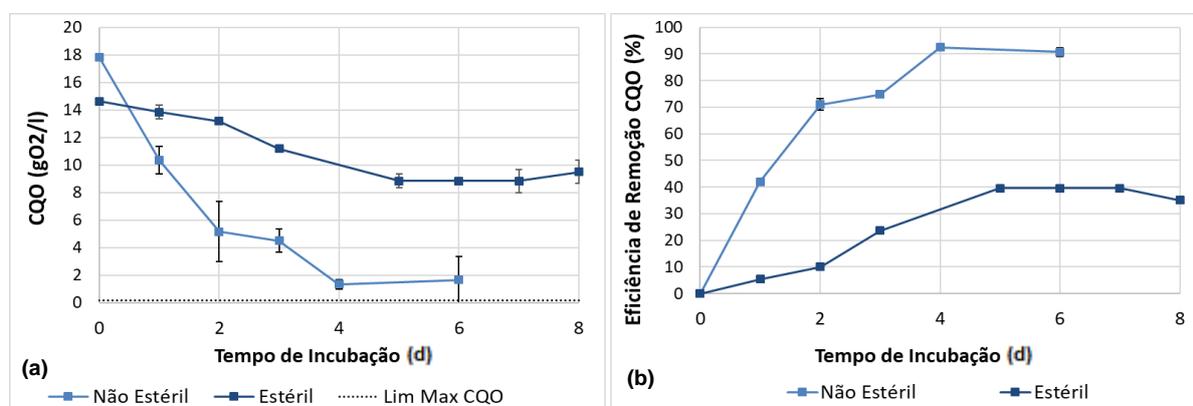


Figura 4.58: Curvas de variação de (a) CQO e de (b) ER de CQO, para os crescimentos mistos em condições de esterilidade e de não esterilidade.

Da Figura 4.58, percebe-se que a remoção de CQO é muito mais eficiente em condições de não esterilidade do que em esterilidade ( $ER_{Esterilidade} = 35,1\%$  e  $ER_{Não Esterilidade} = 90,7\%$ ), o que já era de esperar, uma vez que a proporção de microrganismos em heterotrofia a desenvolver-se no meio não estéril era muito superior. Assim, a concentração final de CQO para condições de não esterilidade ( $1,67 gO_2/L$ ), aproxima-se muito mais do limite máximo legalmente exigido à descarga do efluente tratado ( $0,15 gO_2/L$ ), face ao conseguido em condições de esterilidade ( $9,50 gO_2/L$ ).

#### 4.7.2.2. Nitrogénio Amoniacal e NTK

Da Figura 4.59, percebe-se que em condições de esterilidade, durante o decorrer do ensaio, ocorreu acumulação de  $N - NH_4$  e de NTK, tendo-se obtido, no final do ensaio, as ER:  $ER_{N-NH_4} = -96,0\%$  e  $ER_{NTK} = -34,5\%$ . Para condições de não esterilidade há remoção tanto de  $N - NH_4$ , como de NTK, ainda que não muito significativa para o NTK:  $ER_{N-NH_4} = 71,0\%$  e  $ER_{NTK} = 8,1\%$ . O baixo consumo de  $N$  pode resultar do facto de os compostos nitrogenados presentes no melação não serem assimiláveis pelos microrganismos deste trabalho (como já foi referido anteriormente).

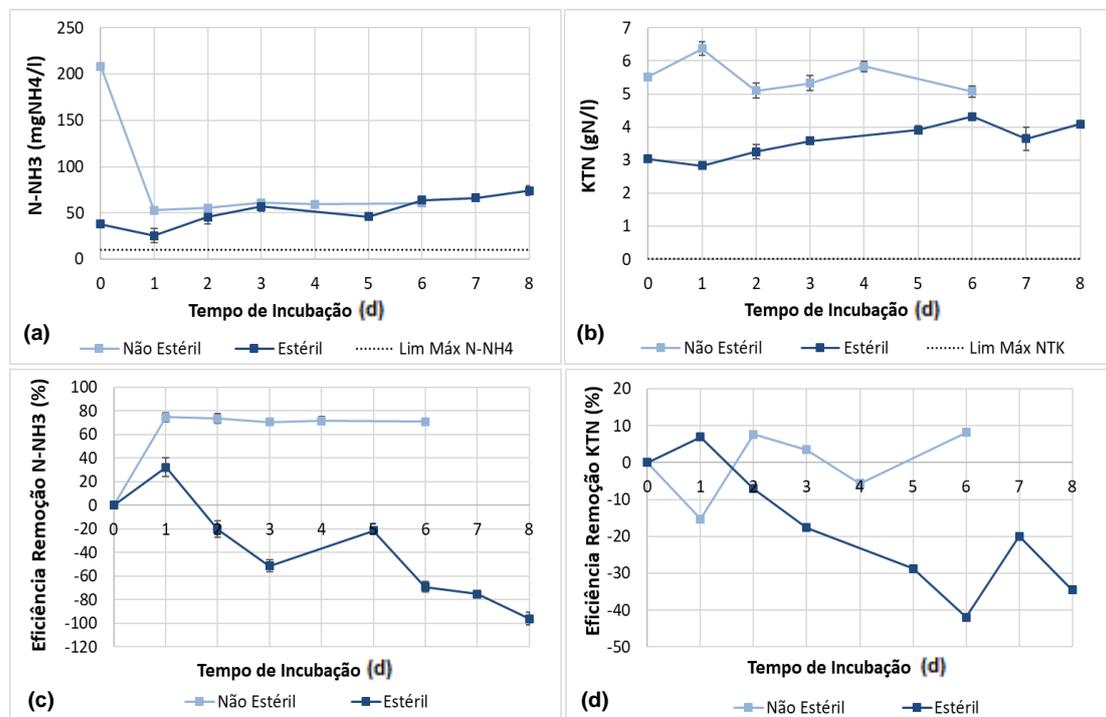


Figura 4.59: (a) e (b) correspondem às curvas de variação das concentrações de nitrogénio amoniacal e total, respectivamente; (c) e (d) às correspondentes ER, para as condições de esterilidade e de não esterilidade.

Percebe-se ainda, claramente, que a esterilização do meio reduz drasticamente as cargas iniciais de  $N - NH_4$  e NTK, o que é visível pela discrepância entre os valores iniciais destes dois parâmetros, entre os dois ensaios. Se compararmos os valores finais de  $N - NH_4$  e de NTK para o ensaio em condições de esterilidade, com os valores iniciais para o ensaio em condições de não esterilidade (iguais aos valores iniciais do ensaio em condições de esterilidade antes de esterilização), percebe-se que para o ensaio em esterilidade também há remoção das cargas de  $N - NH_4$  e de NTK, sendo a remoção de NTK até mais significativa que a obtida em condições de não esterilidade, no entanto, devido ao passo de esterilização e não pelo tratamento biológico, pelo que tem a desvantagem de ter associados os custos de esterilização.

### 4.7.2.3. Fósforo

Pela Figura 4.60, conclui-se que a remoção de *P* é mais eficaz em condições de não esterilidade, com *ER* muito superiores ( $ER_{PO_4^{3-}, Estéril} = -13,9\%$  e  $ER_{PO_4^{3-}, Não Estéril} = 88,5\%$ ;  $ER_{P-PO_4^{3-}, Estéril} = -8,3\%$  e  $ER_{P-PO_4^{3-}, Não Estéril} = 88,2\%$ ;  $ER_{P_2O_5, Estéril} = -11,1\%$  e  $ER_{P_2O_5, Não Estéril} = 88,5\%$ ). Verifica-se ainda, à semelhança do que acontece com as cargas de *N* –  $NH_4$  e NTK, que a etapa de esterilização também reduz significativamente as cargas das 3 espécies de *P*.

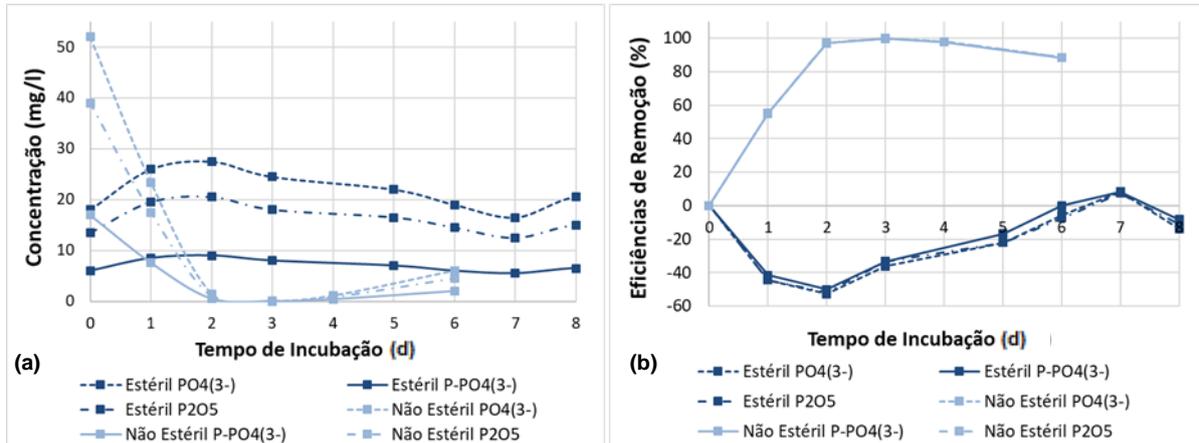


Figura 4.60: (a) Curvas de variação da concentração das 3 espécies de fósforo analisadas:  $PO_4^{3-}$ ,  $P-PO_4^{3-}$  e  $P_2O_5$  no meio, e correspondentes (b) *ER* (%), para condições de esterilidade e de não esterilidade.

Em condições de não esterilidade, as concentrações de *P* no meio chegam a ser nulas, e a  $t=4$  d, quando a cultura atinge a fase de morte, começam a aumentar. Isto pode significar que a fase de morte começou em consequência do esgotamento do *P* no meio, e que houve libertação de *P* para o meio resultante da lise celular. Ainda assim, o facto de ao 2º dia o *P* já ter sido todo removido, é uma grande vantagem face ao tratamento em condições de esterilidade.

### 4.7.2.4. Remoção de Açúcares

Os resultados da análise aos açúcares (sacarose, glucose, frutose e açúcares totais), bem como os correspondentes valores de *ER* determinados, estão apresentados na Figura 4.61.

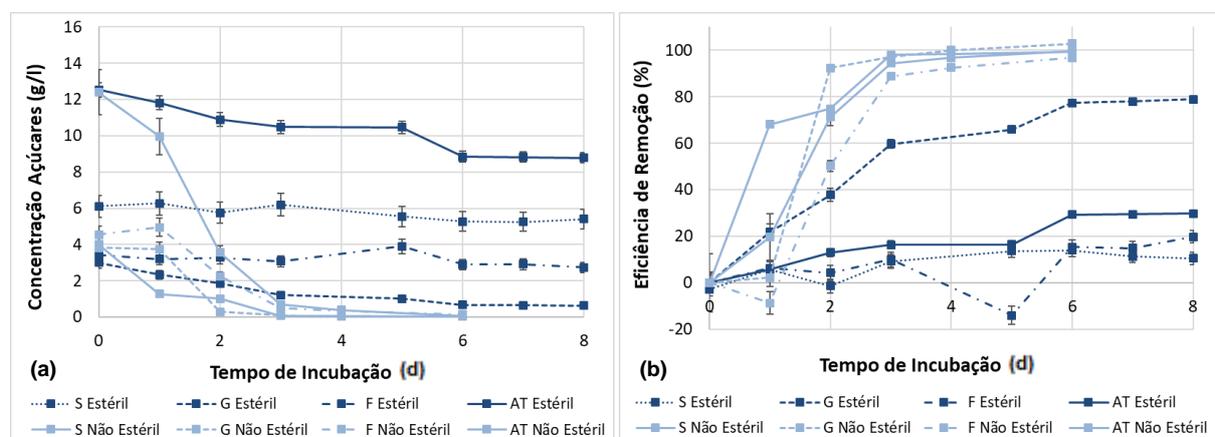


Figura 4.61: (a) Concentração dos 3 açúcares principais: S-Sacarose; G-Glucose e F-Frutose, e ainda dos AT-Açúcares Totais, ao longo do tempo de ensaio, para condições de esterilidade e de não esterilidade. (b) Correspondentes *ER* dos 3 açúcares, assim como dos açúcares totais.

A remoção de açúcares foi muito mais eficiente em condições de não esterilidade, tendo-se esgotado, ao 4º dia de crescimento, todos os açúcares disponíveis no meio, razão pela qual, a cultura a partir daí entra em fase de morte. Para o ensaio em esterilidade, verifica-se, pela Figura 4.61(b), que a glucose é o açúcar com maior *ER*, o que já era de esperar, uma vez que *S. obliquus* e *R. toruloides* têm preferência por este açúcar, consoante já foi referido em capítulos anteriores. A *ER* dos açúcares totais para o ensaio em condições de esterilidade atingiu apenas 29,8%.

### 4.7.3. Citometria de Fluxo

Atendendo à elevada densidade das populações microbianas, bem como dos variadíssimos tamanhos e complexidades celulares observadas durante o crescimento em condições de não esterilidade, tornou-se muito difícil acompanhar as culturas por citometria de fluxo. Na Figura 4.62 estão os citogramas obtidos para a cultura não estéril ao 1º dia de ensaio, da qual se percebe como é difícil fazer uma separação lógica e correcta das populações da microalga e da levedura.

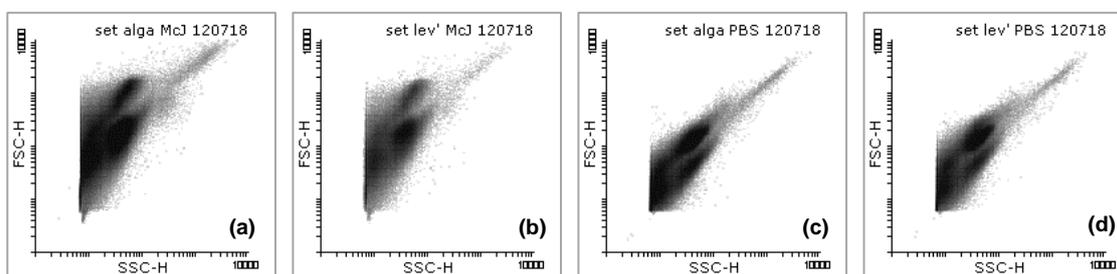


Figura 4.62: Citogramas correspondentes à autofluorescência das células colhidas durante o ensaio suplementado com 10 g/L de açúcares totais, em condições de não esterilidade: (a) e (b) com diluição da amostra em tampão McIlvain, e são correspondentes às definições para *S. obliquus* e *R. toruloides*, respectivamente; (c) e (d) são também correspondentes às definições para *S. obliquus* e *R. toruloides*, respectivamente, mas com diluição da amostra em tampão PBS. O número de eventos foi acertado a aproximadamente 400 eventos/s para as definições

Assim sendo, foi feita por citometria de fluxo a contagem de células e analisada a actividade enzimática e a integridade membranar, apenas para o ensaio em condições de esterilidade. No entanto, para este ensaio também não foi possível fazer a análise da actividade enzimática de *R. toruloides*, pois após incubação das células com os 20 µL de CFDA 10 mg/mL no escuro durante 50 min, deixava de se conseguir identificar a população de *R. toruloides* nos citogramas, Figura 4.63(b).

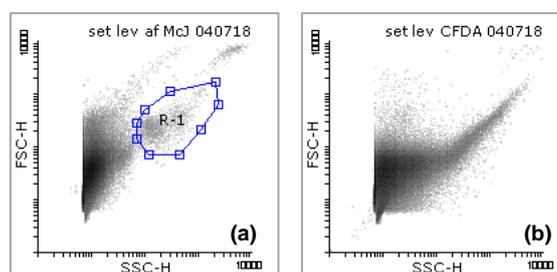


Figura 4.63: Citogramas segundo as definições de *R. toruloides*, e com diluição da amostra em tampão McIlvain, obtidos por (a) autofluorescência (onde é possível identificar a população de *R. toruloides*, R1); e (b) após os 50 min de incubação com 20 µL de CFDA 10 mg/mL (a população de *R. toruloides* deixa de ser identificável).

Na Figura 4.64 estão apresentadas as curvas de variação (em %) das células de *S. obliquus* e *R. toruloides* na população celular total da cultura, sendo que não se converteu em número de células/s, por não ter sido feito um branco para este ensaio. Percebe-se que a população de *R. toruloides* dominou

a cultura mista (a população de *S. obliquus* rondou os 15,0% e a população de *R. toruloides* os 85,0% da população total), embora as proporções entre estas se tenham mantido constantes ao longo do ensaio.

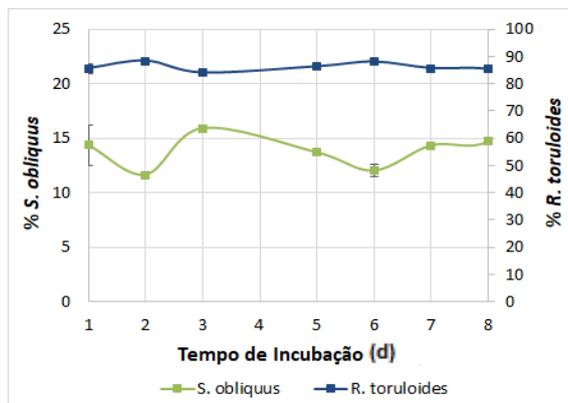


Figura 4.64: Contagem do número de células de *S. obliquus* e *R. toruloides*, por acerto a aproximadamente 400 eventos/s para as definições de *S. obliquus* e a 1000 eventos/s para as definições de *R. toruloides*, durante o desenvolvimento da cultura mista conduzida em condições de esterilidade. Os resultados apresentados são a média dos obtidos para cada definição (sendo que se determinou um valor para cada definição).

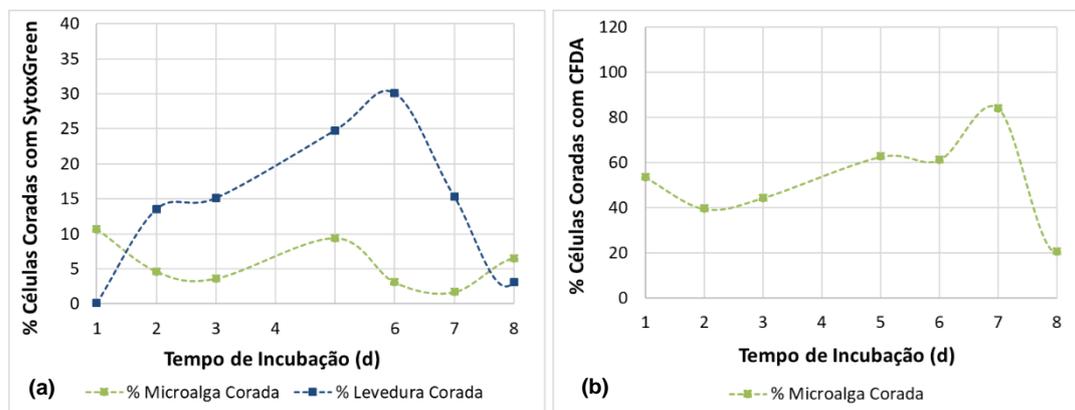


Figura 4.65: (a) Análise da integridade membranar de *S. obliquus* e de *R. toruloides*, durante o desenvolvimento da cultura mista conduzida em condições de esterilidade. Cada amostra foi diluída em tampão PBS para um volume final de 500  $\mu\text{L}$  e aproximadamente 400/1000 eventos/s, respectivamente, e incubação com 5  $\mu\text{L}$  de corante SytoxGreen 30  $\mu\text{M}$ , no escuro, durante 20 min. (b) Análise da actividade enzimática de *S. obliquus*, por diluição da amostra em tampão McIlvain, para um volume final de 500  $\mu\text{L}$  e aproximadamente 400 eventos/s, e incubação com 20  $\mu\text{L}$  de corante CFDA 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , no escuro, durante 50 min.

Por análise da Figura 4.65(a), percebe-se que os perfis das percentagens de células com a membrana permeabilizada (células coradas com SytoxGreen) observados para as populações de *S. obliquus* e *R. toruloides*, ao longo do ensaio da cultura mista em condições de esterilidade, são diferentes, apresentando máximos e mínimos a tempos diferentes. Tendo em conta que a limitação nutricional é uma das causas de permeabilização da membrana (Martins et al., 2018), estes perfis de percentagens de células permeabilizadas para cada um dos microrganismos eram esperáveis, uma vez que a levedura e a microalga, quando esta última se desenvolve em autotrofia, não competem pelos mesmos substratos.

Da análise da actividade enzimática da microalga *S. obliquus* (Figura 4.65(b)), percebe-se que a percentagem de células coradas aumenta do 6º para o 7º dia de crescimento, diminuindo ao 8º dia, o que corresponde à entrada da cultura na fase estacionária.

#### 4.7.4. Resumindo

Apenas em condições de esterilidade é possível manter as culturas de *S. obliquus* e de *R. toruloides*, e inclusivamente a simbiose entre estas. No entanto, o tratamento do efluente é muito mais eficaz em condições de não esterilidade, ao contrário da produção de lípidos intracelulares, que é desprezável no crescimento em não esterilidade e bastante significativa no crescimento em esterilidade. Ainda assim, o processo em condições não assépticas, é mais simples e barato, e portanto a sua aplicação à escala industrial pode diminuir o consumo de energia e de tempo (Taskin et al., 2016).

#### 4.8. Tratamento Sequencial do Efluente

Dos Capítulos 4.3 e 4.4, conclui-se que uma vez na presença de compostos orgânicos no meio, a microalga *S. obliquus* opta por seguir a via mixotrófica, o que põe em causa o objectivo inicial da microalga remover compostos como o  $N - NH_3$ , o NTK e o  $P$ , por autotrofia. Assim, pensou-se na hipótese de se fazer um tratamento por etapas, em que numa fase inicial tanto *S. obliquus* como *R. toruloides* contribuem para a remoção da carga orgânica do meio e, numa segunda fase, quando houver limitação de substrato, *R. toruloides*, microrganismo heterotrófico obrigatório, entra em fase de morte, e *S. obliquus* segue pela via autotrófica, através da qual irá remover as cargas de  $N - NH_3$ , de NTK e de  $P$  do meio. Assim, de forma a que esta teoria pudesse ser testada, o ensaio efectuado em condições de esterilidade com 10 g/L de açúcares totais no meio, não foi interrompido ao 8º dia de crescimento, quando a cultura entrou em fase estacionária, e deixou-se ficar em crescimento até ao 14º dia de incubação. Neste capítulo vai ser apresentado a continuação dos resultados deste ensaio, até ao 14º dia de crescimento.

Uma vez atingida a fase estacionária, o número de células da levedura caiu significativamente. No entanto, as células de *S. obliquus* ficaram mais verdes e maiores (Figura 4.66), sugerindo que a partir do momento em que começou a haver limitação do  $C$ , a microalga seguiu a via autotrófica (através das Figuras 4.68 e 4.70(b) verifica-se que, para  $t=13$  d, as concentrações de CQO e de açúcares atingiram praticamente 50% das concentrações iniciais). Só assim se explica que a levedura tivesse entrado em fase de morte e a microalga, pelo contrário, tivesse permanecido aparentemente saudável.

Na Figura 4.66 são apresentadas as imagens obtidas por microscopia óptica, com lente de imersão, correspondentes aos 8º, 9º e 13º dias de incubação.

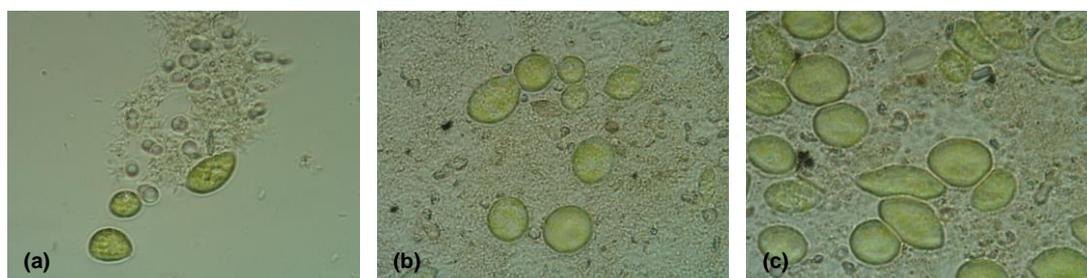


Figura 4.66: Imagens obtidas por microscopia óptica, com ampliação 1000x, ou seja, com lente de imersão, para os (a) 8º, (b) 9º e (c) 13º d de crescimento.

Na Figura 4.67 são apresentados alguns dos citogramas, obtidos ao 1º, 6º, 9º e 13º dias de incubação.

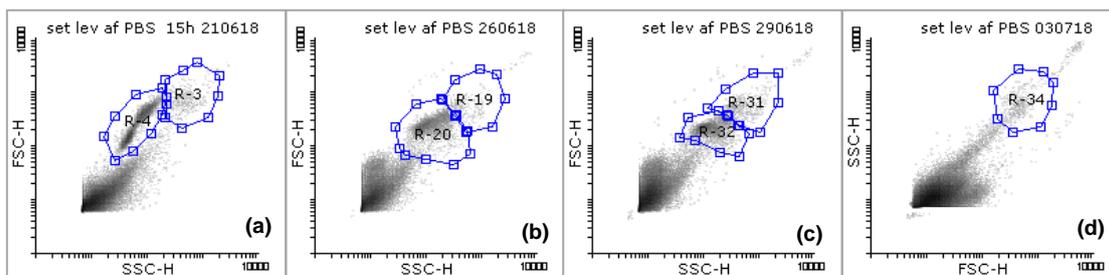


Figura 4.67: Citogramas correspondentes à análise das amostras colhidas no: (a) 1º, (b) 6º, (c) 9º e (d) 13º dias de crescimento, para os quais a região correspondente a *R. toruloides* é, respectivamente: R4, R20, R32 e ausente para o 13º dia de incubação.

Da Figura 4.67, vemos que a partir do 6º dia de incubação (início da fase estacionária), a mancha correspondente à população de *R. toruloides* vai tomando valores de FSC cada vez menores. Ao 13º dia, já não se detecta qualquer mancha correspondente à levedura, embora da observação ao microscópio se tivessem observado algumas leveduras na cultura, ainda que muito poucas e de menores dimensões.

Posto isto, por comparação dos resultados obtidos por análise ao microscópio e por citometria de fluxo, comprova-se que o prolongamento do crescimento induziu o desaparecimento da população de *R. toruloides* mas manteve a população de *S. obliquus*, que aparentemente continuou a desenvolver-se em autotrofia.

Ao 8º dia de crescimento, assiste-se a um aumento do CQO (Figura 4.68) talvez em consequência da morte e subsequente lise celular de *R. toruloides*, uma vez que as membranas plasmáticas contêm muitas proteínas, além das inúmeras biomoléculas intracelulares (compostas maioritariamente por *C*); no entanto, ao 9º dia a carga de CQO volta a diminuir.

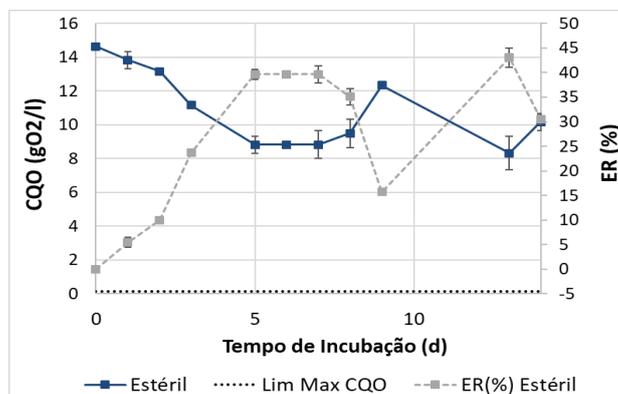


Figura 4.68: Variações das cargas de CQO, e respectivas eficiências de remoção, com o tempo de incubação, prolongando o crescimento 6 d após a cultura atingir a fase estacionária.

Em relação ao *N*, observou-se uma nítida redução das cargas tanto de  $N - NH_3$  como de NTK, após o 8º dia, tendo este atingido as concentrações de  $40,6 \text{ mgNH}_4/\text{L}$  e  $2,74 \text{ gN/L}$ , respectivamente (Figura 4.69). Ainda assim, para que o tratamento fosse satisfatório, seria necessário que as concentrações finais destes contaminantes se aproximassem ainda mais dos correspondentes limites máximos legalmente exigidos ( $10,0 \text{ mgNH}_4/\text{L}$  e  $15,0 \text{ mgN/L}$ , respectivamente). Contudo, prolongando o ensaio, as *ER* obtidas ao 14º dia de crescimento para o  $N - NH_3$  e NTK foram, respectivamente,  $-7,5\%$  e

10,0%, bastante superiores às conseguidas apenas com 8 d de crescimento (-96,0% e -34,5%, respectivamente) (ver Tabela 4.8).

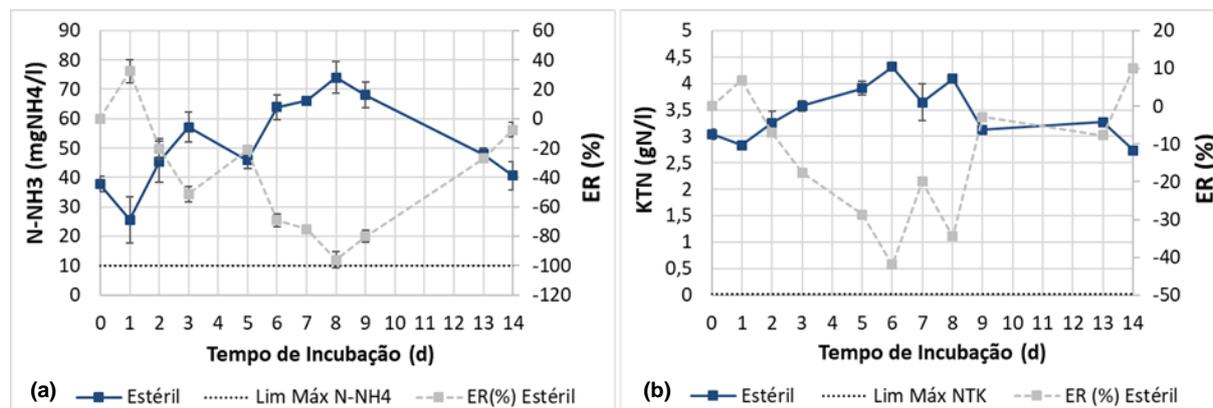


Figura 4.69: Variações das cargas de (a) N-NH<sub>4</sub> e correspondentes ER; e de (b) NTK e as respectivas ER, com o tempo de incubação, prolongando o crescimento 6 d após a cultura atingir a fase estacionária.

Quanto à carga do meio nos três tipos de *P* e de açúcares (Figura 4.69), a remoção a partir do 8º dia de incubação não é muito notória, tendo atingido as concentrações de:  $C_f(PO_4^{3-}) = 16,5 \text{ g/L}$ ,  $C_f(P - PO_4^{3-}) = 5,5 \text{ g/L}$ ,  $C_f(P_2O_5) = 12,5 \text{ g/L}$ ,  $C_f(\text{Sacarose}) = 4,37 \text{ g/L}$ ,  $C_f(\text{Glucose}) = 0,63 \text{ g/L}$ ,  $C_f(\text{Frutose}) = 2,85 \text{ g/L}$  e  $C_f(\text{Açúcares Totais}) = 7,86 \text{ g/L}$ . Relativamente aos açúcares totais, já era de esperar a reduzida remoção destes a partir do 8º dia de crescimento, uma vez que a microalga segue a via autotrófica, tendo sido as *ER* obtidas do 8º para o 14º dia de 19,2%, 0,1%, -3,9% e 10,6%, para a sacarose, glucose, frutose e açúcares totais, respectivamente.

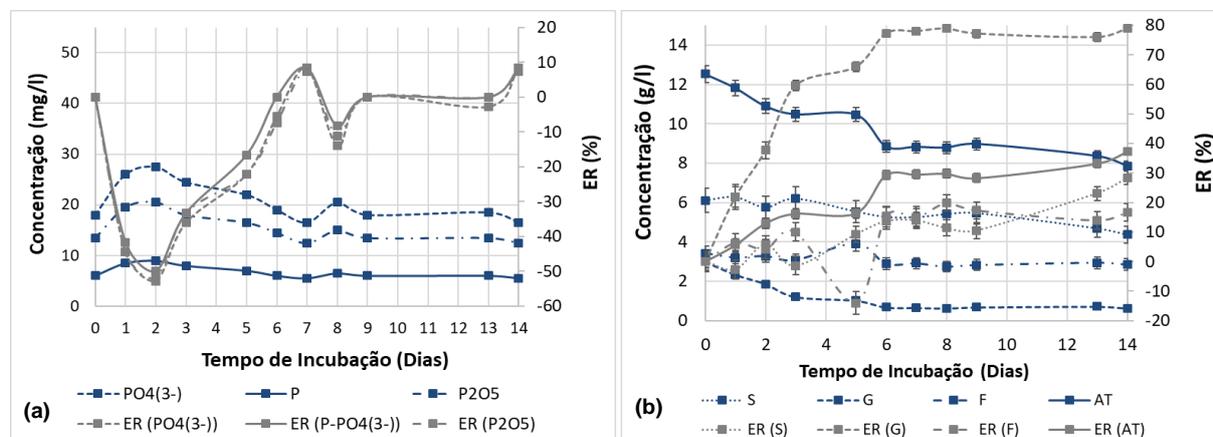


Figura 4.70: Variações das cargas (a) dos 3 tipos de fósforo analisados:  $PO_4^{(3-)}$ ,  $P-PO_4^{(3-)}$  e  $P_2O_5$  e das correspondentes ER; e (b) dos 3 açúcares principais e dos açúcares totais, bem como das correspondentes ER, com o tempo de incubação, prolongando o crescimento 6 d após a cultura atingir a fase estacionária.

#### 4.8.1. Resumindo

Em termos de remoção de CQO e de *P* não parece haver vantagem em prolongar o ensaio do 8º ao 14º dia de crescimento. Para a remoção dos açúcares, embora não se verifique uma grande melhoria com o prolongamento do ensaio, conseguem-se resultados melhores que os obtidos ao 8º dia de crescimento. No entanto, em termos de remoção das cargas de *N - NH<sub>3</sub>* e NTK, há uma significativa melhoria com o prolongamento do ensaio até ao 14º dia de incubação. Talvez a solução passe por prolongar ainda mais o crescimento.

#### 4.9. Comparação dos Resultados Obtidos Para Todos os Ensaios

As Tabelas 4.7 e 4.8 mostram os resultados obtidos ao longo deste trabalho, para todas as condições estudadas.

A cultura pura da microalga *S. obliquus* desenvolvida no meio constituído pelo efluente da indústria cervejeira e melaço de cana-de-açúcar, com a concentração de açúcares totais de 5 g/L, resultou na máxima  $DO_{540\text{ nm}}$  (1,43), tendo-se observado para esta cultura a máxima taxa específica de crescimento ( $\mu = 0,73\text{ d}^{-1}$ ), em relação às restantes culturas puras da microalga estudadas. Também se verificou, através da citometria de fluxo, que as células de *S. obliquus* nesta cultura se apresentaram maiores e mais complexas, tendo sido observadas as percentagens mais elevadas de células metabolicamente activas (com actividade enzimática e com a membrana íntegra) em relação às restantes culturas puras da microalga estudadas. Embora a esta concentração de açúcares totais não se tenham observado as maiores eficiências de remoção do  $N - NH_3$  e das três espécies de *P* analisadas (principal interesse na utilização de microalgas), foi a que permitiu que os parâmetros estudados do efluente tratado se aproximassem mais dos limites máximos legalmente exigidos para descarga no ambiente, ou para a sua reutilização para outros fins. No entanto, a produção de lípidos intracelulares nesta cultura foi baixa (2,1% (p/p)).

Observou-se que a viabilidade e o crescimento celulares para a microalga *S. obliquus* foram significativamente afectados pela presença de concentrações de açúcares totais no meio superiores a 20 g/L. Observou-se ainda, que o teor de lípidos totais foi inferior a 2,6% (p/p) para todos os ensaios estudados com a cultura pura da microalga.

Relativamente às culturas puras da levedura *R. toruloides*, observou-se que a mesma só se desenvolveu no efluente industrial quando este foi suplementado com uma fonte de carbono (melaço de cana-de-açúcar). De entre as concentrações de açúcares totais nas culturas puras da levedura que se estudaram, a que favoreceu mais o crescimento celular e o tratamento do efluente foi 20 g/L. Também foi a esta concentração que se obtiveram os maiores valores de  $DO_{600\text{ nm}}$  (6,30) e  $\mu$  ( $0,42\text{ dias}^{-1}$ ) da cultura, o maior teor em ácidos gordos (16,5% p/p), e que se observaram as mais elevadas percentagens de células metabolicamente activas (através da detecção da actividade enzimática e da integridade da membrana), acrescido do facto de ter sido esta concentração que assegurou as maiores eficiências de remoção de CQO, de  $N - NH_3$ , de *P* e de açúcares totais, e que permitiu concentrações finais destes contaminantes no efluente mais próximas dos limites máximos legalmente exigidos para um efluente tratado.

Por comparação dos resultados obtidos dos crescimentos das culturas puras de *S. obliquus* e de *R. toruloides*, conclui-se que, para as condições operacionais utilizadas e, por comparação apenas dos crescimentos correspondentes às condições mais favoráveis a cada um dos microrganismos (5 g/L de açúcares totais para *S. obliquus* e 20 g/L de açúcares totais para *R. toruloides*), o crescimento da microalga *S. obliquus* apresenta valores de  $\mu$  superiores em relação à levedura *R. toruloides*, o que revela a melhor adaptação da microalga ao efluente industrial estudado e à suplementação deste com melaço de cana-de-açúcar.

Da análise de todos os ensaios realizados com cultura mista de *S. obliquus* e *R. toruloides* e, tendo em conta a produção de biomassa, a produção de lípidos intracelulares, e o tratamento do efluente, concluiu-se que a suplementação do efluente com melaço de cana-de-açúcar a fim de obter a concentração de 10 g/L de açúcares totais, é a opção mais favorável.

O desenvolvimento da cultura mista no meio contendo efluente e melaço de cana-de-açúcar, com uma concentração de açúcares totais de 10 g/L, conduzida em condições de esterilidade permitiu obter a máxima  $DO_{600\text{ nm}}$  (1,20), em relação ao ensaio conduzido nas mesmas condições, mas em não esterilidade ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,93$ ); no entanto, a taxa específica de crescimento no primeiro ensaio foi mais baixa do que no segundo ( $\mu_{\text{Estéril}} = 0,52 \text{ dias}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{Não Estéril}} = 0,79 \text{ dias}^{-1}$ ). Verificou-se que o tratamento do efluente foi mais eficiente em condição de não esterilidade do que em esterilidade. No entanto, a maior produção de ácidos gordos em esterilidade (teor de ácidos gordos obtido no ensaio em condições de esterilidade: 17,6% (p/p); teor de ácidos gordos obtido no ensaio em condições de não esterilidade: 1,6% (p/p)), leva a que a escolha entre esterilidade e não esterilidade não seja imediata, sendo necessário um estudo sobre a viabilidade ambiental e económica do processo em ambas as condições, para se poder concluir qual delas é a mais viável.

Ao longo do trabalho foram-se percebendo algumas limitações, nomeadamente: elevadas taxas de evaporação do meio; limitações nutricionais, tendo sido as mais significativas, provavelmente, a limitação por  $O_2$ , em resultado dos ensaios terem sido realizados em frascos agitados, e a limitação por  $N$ , uma vez que a carga do efluente em  $N$  é muito baixa e que os compostos nitrogenados do melaço de cana-de-açúcar não garantem o crescimento de leveduras; e ainda a presença de compostos inibitórios existentes no melaço de cana-de-açúcar. É certo que estes factores condicionaram os crescimentos e impediram que se obtivessem maiores produções de biomassa, assim como tratamentos mais eficazes.

É ainda necessário ter em conta que na sua constituição, o melaço de cana-de-açúcar tem compostos orgânicos, entre os quais compostos orgânicos nitrogenados, que não são assimiláveis pelos microrganismos utilizados neste trabalho. São exemplo, os compostos orgânicos complexos, como as melanoidinas (estão presentes no melaço e resultam da reacção entre o grupo carbonilo de um açúcar com o grupo amino de um aminoácido a cerca de 100°C, durante o processo de fervura do caldo da cana-de-açúcar para extracção do açúcar) e outros compostos aromáticos. Assim sendo, a suplementação do efluente com melaço de cana-de-açúcar condiciona, logo à priori, o tratamento do efluente, pelo menos em termos de remoção do carbono e do nitrogénio orgânicos. É por isto, que em nenhum dos crescimentos se conseguiu assegurar uma eficiente remoção da carga orgânica nem do nitrogénio.

Tabela 4.7: Resumo dos resultados obtidos com o crescimento da microalga *S. obliquus* e da levedura *R. toruloides*, enquanto culturas puras e em condições de esterilidade, em efluente e em efluente suplementado com melão de cana-de-açúcar. Desvio  $Lim_{máx} = |C_f - Lim_{máx}|/Lim_{máx}$ , e corresponde ao desvio em relação ao limite máximo legal. Os resultados são apresentados na forma: Média  $\pm$  Desvio Padrão.

	Tratamento com Cultura pura de <i>S. obliquus</i>						Tratamento com Cultura pura de <i>R. toruloides</i>					
	<i>Eflu.</i>	5 g/L	10 g/L	20 g/L	40 g/L	60 g/L	<i>Eflu.</i>	20 g/L	40 g/L	60 g/L	80 g/L	100 g/L
$X_{máx}(DO)$	0,42 $\pm$ 0,05	1,80 $\pm$ 0,14	1,66 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,00	0 $\pm$ 0,01	6,27 $\pm$ 0,21	2,43 $\pm$ 0,05	2,66 $\pm$ 0,18	2,25 $\pm$ 0,09	1,94 $\pm$ 0,07
$\mu (d^{-1})$	0,17 $\pm$ 0,03	0,73 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	-0,28 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,00	0,23 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,00
$t_d (d)$	4,03 $\pm$ 0,88	0,95 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,03	1,85 $\pm$ 0,27	7,38 $\pm$ 0,97	10,70 $\pm$ 0,88	-2,51 $\pm$ 0,39	1,67 $\pm$ 0,06	2,76 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,36	3,09 $\pm$ 0,59	7,37 $\pm$ 0,17
$Px_{máx} ((g/L)/d)$	0,02 $\pm$ 0,15	0,17 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,13	–	–	-0,03 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,05
Ácidos Gordos (%p/p)	2,3 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,1	–	–	1,9 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0
$Lim_{máx}(CQO) (gO_2/L)$	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
$C_f (gO_2/L)$	2,20 $\pm$ 0,00	7,54 $\pm$ 0,40	19,75 $\pm$ 0,58	39,88 $\pm$ 4,38	112,5 $\pm$ 2,0	138,8 $\pm$ 0,0	0,24 $\pm$ 0,00	21,63 $\pm$ 0,63	101,5 $\pm$ 9,5	168,8 $\pm$ 9,8	276,0 $\pm$ 2,0	483,8 $\pm$ 5,3
ER (%)	54,0 $\pm$ 0,8	52,9 $\pm$ 2,3	32,3 $\pm$ 2,0	25,80 $\pm$ 8,1	-36,4 $\pm$ 2,4	-172,1 $\pm$ 0,0	-28,6 $\pm$ 0,5	30,2 $\pm$ 2,0	-38,1 $\pm$ 7,9	-33,10 $\pm$ 5,7	-16,5 $\pm$ 0,8	-59,9 $\pm$ 5,3
Desvio $Lim_{máx}$	13,7	49,3	130,7	264,9	749	924,3	0,6	143,2	675,7	1124	1839	3224
$Lim_{máx}(N - NH_3) (mgNH_4/L)$	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
$C_f (mgNH_4/L)$	17,2 $\pm$ 2,6	30,4 $\pm$ 1,9	33,0 $\pm$ 1,3	68,8 $\pm$ 1,4	134,0 $\pm$ 0,0	202,7 $\pm$ 0,0	82,8 $\pm$ 5,3	43,2 $\pm$ 4,8	110,9 $\pm$ 7,0	148,7 $\pm$ 4,8	195,9 $\pm$ 6,2	252,1 $\pm$ 5,9
ER (%)	25,9 $\pm$ 5,3	20,3 $\pm$ 4,0	43,7 $\pm$ 2,1	23,2 $\pm$ 1,6	32,8 $\pm$ 1,1	19,7 $\pm$ 0,0	-16,3 $\pm$ 0,7	66,2 $\pm$ 0,4	37,3 $\pm$ 0,1	32,5 $\pm$ 0,0	27,3 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 1,3
Desvio $Lim_{máx}$	0,72	2,04	2,3	5,88	12,4	19,27	7,28	3,32	10,09	13,87	18,59	24,21
$Lim_{máx}(NTK) (gN/L)$	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
$C_f (gN/L)$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ER (%)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Desvio $Lim_{máx}$	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
$C_f (PO_4^{3-}) (mg/L)$	32	25	22	88,5	55,5	72	75	43	81,5	81,5	87,5	114,5
ER ( $PO_4^{3-}$ ) (%)	22,0	37,5	38,9	-121,3	7,5	-7,5	-76,5	18,1	-44,2	-38,1	-27,7	-65,9
$C_f (P - PO_4^{3-}) (mg/L)$	10	8	7	29	18	23,5	24,5	14	26,5	26,5	28,5	37,5
ER ( $P - PO_4^{3-}$ ) (%)	23,1	38,5	41,7	-123,1	7,7	-6,8	-75	17,6	-43,2	-35,9	-26,7	-66,7
$C_f (P_2O_5) (mg/L)$	24	19	16,5	66	41,5	54	56	12,8	61	61	65,5	85,5
ER ( $P_2O_5$ ) (%)	22,6	36,7	38,9	-120	7,8	-8	-75	67,2	-45,2	-38,6	-28,4	-66,0
$C_f (AT) (g/L)$	0,39 $\pm$ 0,01	2,49 $\pm$ 0,05	4,58 $\pm$ 0,15	16,07 $\pm$ 0,06	43,56 $\pm$ 0,01	67,32 $\pm$ 5,1	0,00 $\pm$ 0,00	11,50 $\pm$ 0,11	44,37 $\pm$ 0,78	72,03 $\pm$ 0,65	98,14 $\pm$ 1,92	133,3 $\pm$ 0,0
ER (AT) (%)	38,9 $\pm$ 0,1	59,5 $\pm$ 0,6	59,1 $\pm$ 1,9	26,7 $\pm$ 0,7	-103,9 $\pm$ 0,0	-3,1 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,0	55,0 $\pm$ 0,0	9,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	-1,6 $\pm$ 0,0

Tabela 4.8: Tabela 4.8: Resumo dos resultados obtidos com o crescimento da microalga *S. obliquus* e da levedura *R. toruloides*, enquanto cultura mista, em efluente e em efluente suplementado com melão de cana-de-açúcar. Correspondentes aos ensaios até 60 g/L de açúcares totais no meio, a 10 g/L de açúcares totais em condições de esterilidade e de não esterilidade, e ao estudo do tratamento sequencial. Desvio  $Lim_{máx} = |C_f - Lim_{máx}|/Lim_{máx}$ , e corresponde ao desvio em relação ao limite máximo legal. Os resultados são apresentados na forma: Média  $\pm$  Desvio Padrão.

	Tratamento com Cultura Mista						Tratamento com Cultura Mista em 10 g/L		
	<i>Eflu.</i>	5 g/L	10 g/L	20 g/L	40 g/L	60 g/L	Estéril	Não Estéril	Por Etapas (14º dia)
$X_{máx}(DO)$	0,28 $\pm$ 0,09	2,33 $\pm$ 0,03	5,73 $\pm$ 0,08	4,90 $\pm$ 0,04	4,09 $\pm$ 0,08	4,43 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 0,03	1,87 $\pm$ 0,00
$\mu (d^{-1})$	0,09 $\pm$ 0,01	1,02 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01
$t_d (d)$	7,81 $\pm$ 0,95	0,68 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,07	1,09 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,03
$Px_{máx} ((g/L)/d)$	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ácidos Gordos (%p/p)	2,6 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 0,3	19,6 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,2	–	17,6 $\pm$ 0,2	1,61 $\pm$ 0,1	13,2 $\pm$ 0,1
$Lim_{máx}(CQO) (gO_2/L)$	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
$C_f (gO_2/L)$	0,17 $\pm$ 0,01	4,42 $\pm$ 0,58	8,83 $\pm$ 0,50	32,00 $\pm$ 1,00	109,3 $\pm$ 0,8	498,0 $\pm$ 1,3	9,50 $\pm$ 0,83	1,67 $\pm$ 1,67	10,17 $\pm$ 0,50
ER (%)	51,9 $\pm$ 3,6	37,6 $\pm$ 8,2	37,6 $\pm$ 3,5	0,8 $\pm$ 3,1	–58,3 $\pm$ 1,1	–312,4 $\pm$ 0,0	35,1 $\pm$ 1,7	90,7 $\pm$ 0,3	30,5 $\pm$ 1,0
Desvio $Lim_{máx}$	0,13	28,50	57,90	212,30	727,30	3319,00	62,30	10,13	66,80
$Lim_{máx}(N - NH_3) (mgNH_4/L)$	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
$C_f (mgNH_4/L)$	8,1 $\pm$ 2,5	13,7 $\pm$ 0,2	22,2 $\pm$ 0,2	44,2 $\pm$ 0,3	97,5 $\pm$ 0,4	–	74,1 $\pm$ 5,3	60,4 $\pm$ 1,8	40,6 $\pm$ 4,8
ER (%)	83,0 $\pm$ 5,3	78,6 $\pm$ 0,4	70,6 $\pm$ 0,2	48,4 $\pm$ 0,4	28,4 $\pm$ 0,3	–	–96,0 $\pm$ 3,1	71,0 $\pm$ 2,8	–7,5 $\pm$ 0,4
Desvio $Lim_{máx}$	0,19	0,37	1,22	3,42	8,75	13,48	6,41	5,04	3,06
$Lim_{máx}(NTK) (gN/L)$	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
$C_f (gN/L)$	–	–	–	–	–	–	4,09 $\pm$ 0,01	5,07 $\pm$ 0,16	2,74 $\pm$ 0,00
ER (%)	–	–	–	–	–	–	–34,50 $\pm$ 0,01	8,10 $\pm$ 0,53	10,00 $\pm$ 0,00
Desvio $Lim_{máx}$	–	–	–	–	–	–	271,7	337	181,7
$C_f (PO_4^{3-}) (mg/L)$	19,5	15,0	10,5	16,5	23,0	31,0	20,5	6,0	16,5
ER ( $PO_4^{3-}$ ) (%)	50,0	63,0	74,7	63,3	52,1	38,6	–13,9	88,5	8,3
$C_f (P - PO_4^{3-}) (mg/L)$	6,5	5,0	3,5	5,5	7,5	10,0	6,5	2,0	5,5
ER ( $P - PO_4^{3-}$ ) (%)	48,0	62,0	74,1	62,1	51,6	37,5	–8,3	88,2	8,3
$C_f (P_2O_5) (mg/L)$	14,5	11,0	8,0	12,0	17,0	23,0	15,0	4,5	12,5
ER ( $P_2O_5$ ) (%)	50,0	63,3	74,2	64,7	52,1	38,7	–11,1	88,5	7,4
$C_f (AT) (g/L)$	0,00 $\pm$ 0,00	1,25 $\pm$ 0,09	4,60 $\pm$ 0,10	13,60 $\pm$ 0,30	33,30 $\pm$ 1,30	–	8,79 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,00	7,86 $\pm$ 0,03
ER (AT) (%)	100,0 $\pm$ 0,0	72,9 $\pm$ 0,2	54,8 $\pm$ 0,1	37,4 $\pm$ 0,1	9,9 $\pm$ 0,4	–	99,5 $\pm$ 0,2	29,8 $\pm$ 0,0	37,3 $\pm$ 0,1

## 5. Conclusões e Trabalho Futuro

Conclui-se que o tratamento do efluente utilizando a cultura mista apresenta vantagens face ao tratamento com culturas puras de *R. toruloides*; no entanto, não apresenta vantagens face ao tratamento com culturas puras de *S. obliquus*. A suplementação do efluente com melação de cana-de-açúcar, para que o crescimento de *R. toruloides* seja possível, e o conseqüente aumento da carga de contaminantes (CQO,  $N - NH_3$ , NTK e P), leva a que o resultado final do tratamento com cultura pura de *R. toruloides* e com cultura mista tenham cargas destes contaminantes muito superiores às conseguidas com o tratamento com cultura pura de *S. obliquus* sem suplementação, permitindo que no final o efluente esteja praticamente tratado, ao passo que uma vez suplementado, as concentrações dos contaminantes no final do tratamento ainda se afastam bastante das concentrações máximas legalmente exigidas para a descarga do efluente tratado na natureza, ou para a sua reutilização nos processos. Daqui, resulta que de entre todos os tratamentos biológicos analisadas, o que assegura um melhor tratamento do efluente, é o tratamento biológico com cultura pura de *S. obliquus* apenas em efluente, seguido do tratamento com cultura pura de *S. obliquus* em efluente suplementado com 5 g/L de açúcares totais. No entanto, uma vez que o objectivo deste trabalho consistiu no tratamento biológico do efluente industrial com a produção simultânea de produtos lipídicos intracelulares, conclui-se que o tratamento do efluente apenas com a cultura pura de *S. obliquus*, ou em meio suplementado com 5 g/L de açúcares totais, não atingiu esse objectivo, uma vez que o teor de lípidos obtido nesse ensaio foi muito baixo (Tabela 4.7).

Por outro lado, a produção de ácidos gordos pelas culturas puras de *S. obliquus* e *R. toruloides*, para os crescimentos em 5 g/L (ou mesmo apenas em efluente) e 20 g/L, respectivamente, correspondentes às condições mais favoráveis para cada um destes microrganismos (2,1% e 16,5% (p/p), respectivamente), é inferior à produção conseguida pela cultura mista, também para a condição mais favorável, 10 g/L (19,6% (p/p)), o que é uma grande vantagem do processo de tratamento com cultura mista, face aos tratamentos enquanto culturas puras.

Em conclusão, o tratamento biológico do efluente da indústria cervejeira não foi eficaz em nenhuma das condições estudadas (entre as várias concentrações de açúcar analisadas, entre culturas puras e cultura mista, e independentemente das condições de esterilidade), uma vez que, após o tratamento, não se conseguiu, para nenhuma das condições, um efluente tratado a cumprir os limites máximos legalmente exigidos para a sua descarga na natureza ou à sua reutilização em processos industriais. No entanto, conseguiu obter-se um teor de lípidos intracelulares de cerca de 20,0% (p/p) com o tratamento utilizando a cultura mista em meio suplementado com 10 g/L de açúcares totais, o que economicamente poderá favorecer o processo. Estes resultados sugerem que o tratamento biológico com cultura mista de *S. obliquus* e *R. toruloides* poderá ter futuro, necessitando, no entanto, de ser optimizado.

O ensaio em que se testou o tratamento sequencial, prolongando o tempo de incubação mostrou que, efectivamente, há melhorias dos resultados, especialmente em termos de remoção de N. Assim, como trabalho futuro, há que desenvolver este trabalho em modo sequencial, ao invés de se utilizar a cultura

mista para tratamento simultâneo do efluente, em que numa primeira etapa o efluente suplementado (20 g/L) é tratado pela levedura *R. toruloides*, de forma a que seja removida a carga orgânica (CQO) e de *P*, e possa haver valorização do processo por produção de produtos lipídicos; numa segunda fase, quando a carga orgânica for vestigial, as leveduras são removidas do meio por processos de separação e é adicionada ao efluente, já parcialmente tratado, a população de microalgas *S. obliquus*, para remoção das cargas de *N* –  $NH_3$  e de *NTK*.

Também seria interessante realizar o processo desenvolvido neste trabalho, utilizando as culturas puras e mista que melhores resultados forneceram em termos de tratamento biológico e de produção de lípidos, nas condições óptimas seleccionadas, utilizando um reactor (inicialmente à escala de bancada, tendo em vista o posterior aumento de escala) com sistema de controlo de pH, de arejamento e de agitação, de forma a evitar alterações no meio de cultura do pH óptimo dos microrganismos, bem como as baixas transferências de massa que frequentemente se observam nas culturas desenvolvidas em frascos agitados, e que são responsáveis pela redução do rendimento dos bioprocessos.

Seria ainda interessante desenvolver este trabalho utilizando efluente primário, visto o efluente secundário apresentar um grau de contaminação já bastante baixo, o que pode ter condicionado os crescimentos, especialmente pela reduzida carga de nitrogénio que apresenta e a qual não é compensada pela suplementação com melaço de cana-de-açúcar. Em trabalhos futuros nos quais se vise o crescimento de leveduras em efluentes secundários da indústria cervejeira com suplementação de melaço-de-cana de açúcar, é essencial a suplementação do meio com uma fonte de nitrogénio.

## Bibliografia

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086>
- AL-Rajhia, S., Raut, N., AL-Qasmi, F., Qasmi, M., & Saadi, A. Al. (2012). Treatments of Industrials Wastewater by Using Microalgae. *2012 International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology*, 41, 217–221.
- Alves, C. (2007a). *Tratamento de Águas de Abastecimento* (2ª Edição). Aveiro-Portugal.
- Alves, C. (2007b). *Tratamento de Águas de Abastecimento* (2ª Edição). Aveiro-Portugal.
- Alves, C. (2007c). *Tratamento de Águas de Abastecimento* (2ª Edição). Aveiro-Portugal.
- Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, 49, 465–474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.036>
- Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25, 207–210.
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bhakta, J. N., Lahiri, S., Pittman, J. K., & Jana, B. B. (2015). Carbon dioxide sequestration in wastewater by a consortium of elevated carbon dioxide-tolerant microalgae. *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*, 10, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2015.02.001>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *ELSEVIER*, 14(2), 557–577. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Browne, C. A. (1929). The Spontaneous Decomposition of Sugar-Cane Molasses. *Chemistry, I-vd Ustrial A N D Engineering*, 21(6), 600–606.
- BTI, C. D. P. in P. B. (2015). Algae to Energy - Using and Re-using a Hemocytometer to Count Algae Cells.
- Cellamare, M., Rolland, A., & Jacquet, S. (2010). Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, 22(1), 87–100. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9439-4>
- Cheng, Y., Lu, Y., Gao, C., & Wu, Q. (2009). Alga-Based Biodiesel Production and Optimization Using Sugar Cane as the Feedstock. *Energy & Fuels*, 23(8), 4166–4173. <https://doi.org/10.1021/ef9003818>
- Cutzu, R., Clemente, A., Reis, A., Nobre, B., Mannazzu, I., Roseiro, J., & Lopes Da Silva, T. (2013). Assessment of ??-carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(8), 865–875. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1278-2>
- Decreto-Lei nº 236/98 , de 1 de agosto de 1998. (1998). In *Assembleia da República* (Vol. 176, pp. 3676–3722).
- Defanti, L. S., Siqueira, N. S., & Linhares, P. C. (2010). Produção de biocombustíveis a partir de algas fotossintetizantes. *Bolsista de Valor - Revista de Divulgação Do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense*, 1, 11–21. Retrieved from <http://essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/BolsistaDeValor/article/view/1786/963>
- Derisio, J. C. (2012). Introdução ao controle de poluição ambiental. In O. de Textos (Ed.) (4ª Edição, pp. 9–11). São Paulo.

- Dias, C., Silva, C., Freitas, C., Reis, A., & da Silva, T. L. (2016). Effect of Medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production Evaluated by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5), 776–787. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2030-y>
- Dias, C., Sousa, S., Caldeira, J., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2015). New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology*, 189, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.009>
- Driessen, W., & Vereijken, T. (2003). Recent developments in biological treatment of brewery effluent. *The Institute and Guild of Brewing Convention, Livingstone, Zambia, March 2-7*, 10. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.105>
- Ebeling, J. M., Timmons, M. B., & Bisogni, J. J. (2006). Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*, 257(1–4), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.019>
- El-Sheekh, M., Abomohra, A. E. F., & Hanelt, D. (2013). Optimization of biomass and fatty acid productivity of *Scenedesmus obliquus* as a promising microalga for biodiesel production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 915–922. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1248-2>
- Feltrin, V. P., Sant'Anna, E. S., Porto, A. C. S., & Torres, R. C. O. (2000). Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(1), 119–124. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000100015>
- Ferreira, A. F., Ortigueira, J., Alves, L., Gouveia, L., Moura, P., & Silva, C. M. (2013). Energy requirement and CO<sub>2</sub> emissions of bioH<sub>2</sub> production from microalgal biomass. *Biomass and Bioenergy*, 49, 249–259. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.033>
- Ferreira, A., Marques, P., Ribeiro, B., Assemany, P., de Mendonça, H. V., Barata, A., ... Gouveia, L. (2018). Combining biotechnology with circular bioeconomy: From poultry, swine, cattle, brewery, dairy and urban wastewaters to biohydrogen. *Environmental Research*, 164(December 2017), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.007>
- Ferreira, A., Ribeiro, B., Marques, P. A. S. S., Ferreira, A. F., Dias, A. P., Pinheiro, H. M., ... Gouveia, L. (2017). *Scenedesmus obliquus* mediated brewery wastewater remediation and CO<sub>2</sub> biofixation for green energy purposes. *Journal of Cleaner Production*, 165, 1316–1327. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.232>
- Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., & Daufin, G. (2006). Water, wastewater and waste management in brewing industries. *Journal of Cleaner Production*, 14(5), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2005.01.002>
- Fonseca, M. M., & Teixeira, J. A. (2007a). Fundamentos e Aplicações. In *Reactores Biológicos* (1ª Edição, pp. 1–26). Lidel - edições técnicas, lda.
- Fonseca, M. M., & Teixeira, J. A. (2007b). Fundamentos e Aplicaçõesb. In *Reactores Biológicos* (1ª Edição, pp. 27–68). Lidel - edições técnicas, lda.
- Fonseca, M. M., & Teixeira, J. A. (2007c). Fundamentos e Aplicaçõesc. In *Reactores Biológicos* (1ª Edição, pp. 69–115). Lidel - edições técnicas, lda.
- Freitas, C., Nobre, B., Gouveia, L., Roseiro, J., Reis, A., & Lopes Da Silva, T. (2014). New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*, 49(4), 554–562. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.022>
- Freitas, C., Parreira, T. M., Roseiro, J., Reis, A., & Da Silva, T. L. (2014). Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. *Bioresource Technology*, 158, 355–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.071>
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 269–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008->

- Hassan, M., Blanc, P. J., Granger, L.-M., Pareilleux, A., & Goma, G. (1996). Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, 31(4), 355–361. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)00077-1)
- Holanda, D. De, & Vinícius, M. (2010). Efeito da fotossíntese na alcalinidade da água de cultivo da tilápia do Introdução Material e métodos. *Ciência Agronômica*, 41, 67–72.
- Horwitz, W., & Latimer, G. (2005). Official methods of analysis. ISBN-13:978-0935584783. Gaithersburg MD, USA: Association of the Official Analytical Chemists (A.O.A.C.) International.
- Hu, W.-S., Zhou, W., Seth, G., Ozturk, S., & Zhang, C. (2012). *Cell Culture Bioprocess Engineering*.
- Hyka, P., Lickova, S., Přebyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(1), 2–16. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>
- José, A., & Coelho, F. (2015). Produção e extração de lípidos e carotenoides a partir da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 e produção de biogás por digestão anaeróbia dos resíduos. Engenharia Biológica.
- JR, M., & JB, Z. (2010). Fundamentals, Sustainability, Design. In Copyright (Ed.), *Environmental Engineering*: (pp. 5–39). USA: John Wiley & Sons.
- Lebaron, P., Catala, P., & Parthuisot, N. (1998). Effectiveness of SYTOX green stain for bacterial viability assessment. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2697–2700. [https://doi.org/0099-2240/98/\\$04.00?0](https://doi.org/0099-2240/98/$04.00?0)
- Li, Y., Zhao, Z. (Kent), & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.008>
- Ling, J., Nip, S., & Shim, H. (2013). Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. *Bioresource Technology*, 146, 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.023>
- Lürling, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 39(2), 85–101. <https://doi.org/10.1051/limn/2003014>
- Ma, C., Wen, H., Xing, D., Pei, X., Zhu, J., Ren, N., & Liu, B. (2017). Molasses wastewater treatment and lipid production at low temperature conditions by a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0797-x>
- Maria, A., & Ferreira, G. (2016). CO<sub>2</sub>-supplemented brewery wastewater treatment by microalgae and biomass upgrading for bioenergy production.
- Martins, V., Dias, C., Caldeira, J., Duarte, L. C., Reis, A., & Lopes da Silva, T. (2018). Carob pulp syrup: A potential Mediterranean carbon source for carotenoids production by *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. *Bioresource Technology Reports*, 3, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.008>
- Mata, T. M., Melo, A. C., Simões, M., & Caetano, N. S. (2012). Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 107, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.109>
- Mata, T. M., Santos, J., Mendes, A. M., Caetano, N. S., & Martins, A. a. (2014). Sustainability evaluation of biodiesel produced from microalgae *Chlamydomonas* sp grown in brewery wastewater. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 823–828. <https://doi.org/10.3303/CET1437138>
- Mihelcic, J. R., & Zimmerman, J. B. (2015). Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 para produção de lípidos e carotenóides, em frascos agitados. *Tese de Dissertação de Mestrado, Instituto Superior de Agronomia*.
- Nebe-Von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R., & Badley, R. A. (2000). Analysis of

- bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), 97–114. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00181-0)
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011a). PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA DE LEHNINGER (5ª Edição, pp. 742–775). artmed, sarvier.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011b). PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA DE LEHNINGER (5ª Edição, pp. 343–345). artmed, sarvier.
- Nicolau, P. B. (2014). Microorganismos e Crescimento Microbiano. Retrieved from [https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2\\_Microorganismos e crescimento microbiano\\_PBN.pdf](https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microorganismos_e_crescimento_microbiano_PBN.pdf)
- Odds, F. C., De Backer, T., Dams, G., Vranckx, L., & Woestenborghs, F. (1995). Oxygen as limiting nutrient for growth of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), 995–997.
- Olajire, A. A. (2012). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., & Tsakalidou, E. (2006). Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology*, 111(3), 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.042>
- Papone, T., Kookkhunthod, S., Paungbut, M., & Leesing, R. (2015). Producing of Microbial Oil by Mixed Culture of Microalgae and Oleaginous Yeast Using Sugarcane Molasses as Carbon Substrate. *Journal of Clean Energy Technologies*, 4(4), 253–256. <https://doi.org/10.7763/JOCT.2016.V4.292>
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 35–42. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Perez, S. (2006). Cell counts using Improved Neubauer haemocytometer, Laboratory Guide. *Oregon State University*.
- Pittman, J. K., Dean, A. P., & Osundeko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.035>
- Quiroz Arita, C. E., Peebles, C., & Bradley, T. H. (2015). Scalability of combining microalgae-based biofuels with wastewater facilities: A review. *Algal Research*, 9, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.001>
- Raposo, M. F. D. J., Oliveira, S. E., Castro, P. M., Bandarra, N. M., Morais, R. M., & Brew, J. I. (2010). On the Utilization of Microalgae for Brewery Effluent Treatment and Possible Applications of the Produced Biomass. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 116(3), 285–292. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00433.x>
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. In A. Richmond (Ed.) (First Publ, pp. 3–10). Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., & Leonardi, A. (2011). Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. *University of Modena and Reggio Emilia, Italy*.
- Santos, M. M. do. (2013). Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel. *Novas tecnologias de colheita de microalgas para a produção de biodiesel*, 60.
- Schultz, J. S. (1964). Cotton Closure As an Aeration Barrier in Shaken Flask Fermentations. *Applied Microbiology*, 12(4), 305–310.
- Shamala, T. R., Drawert, F., & Leupold, G. (1982). Studies on *Scenedesmus acutus* growth. I effect of autotrophic and mixotrophic conditions on the growth of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(6), 1287–1299. <https://doi.org/10.1002/bit.260240605>
- Silva, T. L., Reis, a, Hewitt, C., & Roseiro, J. C. (2004). Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-

line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia*, 77, 32–40.

- Simate, G. S., Cluett, J., Iyuke, S. E., Musapatika, E. T., Ndlovu, S., Walubita, L. F., & Alvarez, A. E. (2011). The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, 273(2–3), 235–247. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.02.035>
- Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
- Tanaka, T., Kamimura, R., Fujiwara, R., & Nakanishi, K. (1994). Crossflow filtration of yeast broth cultivated in molasses. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11), 1094–1101. <https://doi.org/10.1002/bit.260431113>
- Taskin, M., Ortucu, S., Aydogan, M. N., & Arslan, N. P. (2016). Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29. *Renewable Energy*, 99, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.06.060>
- Teles, C., Soares Cunha, J., & Castro, N. (2013). RELATÓRIO EXPERIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO. *Universidade Federal Do Recôncavo Da Bahia*.
- Vacin, F., & Went, F. W. (1949). Some pH changes in the nutrient solutions. *Bot. Gaz.*, 110, 605–613.
- Yan, D., Lu, Y., Chen, Y. F., & Wu, Q. (2011). Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(11), 6487–6493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.036>
- Yang, S., Liu, G., Meng, Y., Wang, P., Zhou, S., & Shang, H. (2015). Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 172, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122>
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., ... Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospordium toruloides*. *Nature Communications*, 3, 1111–1112. <https://doi.org/10.1038/ncomms2112>

## Anexos

### Anexo I - Curvas de Calibração Peso Seco Vs Absorvância

De forma a obter-se uma correlação entre a densidade óptica das amostras, lida por espectrofotometria, durante o decurso dos ensaios, e a respectiva concentração de biomassa, seguiu-se o seguinte protocolo: colocaram-se os filtros (para as culturas puras da microalga foram usados filtros de microfibras de vidro do tipo MFV3047 45  $\mu\text{m}$  de 47 mm de diâmetro; para as culturas puras da levedura e culturas mistas, foram usados filtros estéreis MCE 45  $\mu\text{m}$  de 47 mm de diâmetro) em cadinhos de porcelana e, levaram-se à mufla (Nabertherm, Alemanha) a 550°C durante 1 h para secagem e por fim pesaram-se. Para cada amostra/cultura foram feitas quatro diluições (1:1; 1:2; 1:4; e 1:8) e lidas as correspondentes densidades ópticas (ThermoSpectronic Genesys 20, Portugal), a 540 nm para as culturas puras de microalgas e a 600 nm para as culturas puras de levedura e para as culturas mistas. Cada uma das diluições foi filtrada sob-vácuo (Edwards High Vacuum Pump E2M8 BOC Ltd., Inglaterra), tendo sido o volume de amostra filtrada dependente da concentração desta em açúcar (tendo variado entre 2 mL para as mais concentradas e 10 mL para as de concentração menor/menor diluição). Após filtração, os filtros foram incubados a 100°C (Mettler UM 80, Mettler GmbH+Co.KG, Alemanha) durante a noite, arrefecidos num exsiccador até à temperatura ambiente, e novamente pesados, repetindo-se este ciclo até peso constante dos filtros.

O peso seco de biomassa (PSB, g/L) é calculado por divisão da biomassa seca retida no filtro pelo volume de amostra filtrado, sendo dado pela Eq. 3.1.

$$PSB = \frac{(m_{\text{filtro após filtração}})_{\text{seco}} - (m_{\text{filtro pré filtração}})_{\text{seco}}}{V_{\text{amostra filtrada}}} \quad (\text{Eq. I. 1})$$

Para determinação do peso seco isento de cinzas (PSIC, g/L), exclusivamente feito para as culturas das microalgas devido à fragilidade dos filtros usados para as culturas das leveduras, é necessário acrescentar um passo ao protocolo acima descrito: depois de pesados, os filtros são colocados na mufla (Nabertherm, Alemanha) a 550°C durante 2 h para incineração da matéria orgânica, e novamente pesados. O PSIC é calculado através da Eq. 3.2.

$$PSIC = \frac{(m_{\text{filtro após filtração}})_{\text{seco}} - (m_{\text{filtro pré filtração}})_{\text{seco}} - m_{\text{filtro após incineração}}}{V_{\text{amostra filtrada}}} \quad (\text{Eq. I. 2})$$

Após os cálculos, traçaram-se as curvas de peso seco em função da absorvância.

### Anexo II - Integridade Membranar IP Vs SytoxGreen

Tabela 0.1: Percentagens de células coradas com IP e SytoxGreen, por leitura em FL1 e FL2, para uma amostra com células novas (vivas) e mortas de *S. obliquus*.

	IP (FL1)	IP (FL2)	Sytoxgreen (FL1)	SytoxGreen (FL2)
Células Novas	6,8%	19,3%	10,0%	62,1%
Células Mortas	0,0%	96,4%	97,5%	96,6%

### Anexo III - Lista de Reagentes

Tabela 0.2: Lista de Reagentes utilizados neste trabalho, com respectivas massas molares (MM), fórmulas químicas, graus de pureza e marca.

Nome	MM (g/mol)	Fórmula Química	Grau de Pureza	Marca
Acetona	58,08	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	99,5%	Merck
Cloreto de Etilo	78,50	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> ClO	98,5%	Panreac
Sulfato de Amônio	132,14	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99,0%	Panreac
Glucose	180,16	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	99,5%	Pronolab
Hidrogeno Fosfato de sódio	141,96	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	99,0%	Panreac
Etanoato de Etilo	88,00	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-	Carlo Erba
Frutose	180,16	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	99,5%	Fagron
Ácido Clorídrico	36,45	HCl	37,0%	Merck
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	246,48	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	99,5%	Merck
Malt Extract Agar	-	-	-	Himedia
Metanol	32,04	CH <sub>3</sub> OH	99,8%	Merck
Dihidrogeno fosfato de potássio	136,09	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	99,0%	Panreac
n-Hexano	86,18	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	99,5%	Fisher Chemical
Iodeto de Propídio	668,4	C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	-	Invitrogen
Cloreto de sódio	58,44	NaCl	99,5%	Pronolab
Hidróxido de Sódio	39,99	NaOH	-	José M. Vaz Pereira
Sulfato de sódio anidro	142,04	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	99,0%	Merck
Sacarose	342,3	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	99,5%	Mikrobiologie
Ácido Sulfúrico	98,08	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	97,0%	Merck
Extracto de levedura	-	-	-	BD
Cloreto de Cálcio dihidratado	147,02	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	99,5%	Merck
Sulfato de ferro amoniacal hexahidratado	392,1	Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	99%	Sigma
Cloreto de amônio	53,49	NH <sub>4</sub> Cl	99,8%	Merck