



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 10 • 2021 • art.x

## **Biorremediação ex situ de água proveniente da Lagoa da Ervedeira: Utilização da microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de cálcio**

Mariana da Silva Simões<sup>1\*</sup>

Matilde Lagoa Tarenta<sup>1\*\*</sup>

A eutrofização é um processo de degradação dos ecossistemas aquáticos, consequência do aumento de nutrientes na água, essencialmente fósforo e azoto, que transformam completamente a qualidade da água. Assim, é necessário recorrer a técnicas de biorremediação. Um método eficaz é a fitorremediação, um processo que utiliza algas que assimilam os nutrientes. O presente trabalho estuda a possibilidade deste método se poder aplicar na Lagoa da Ervedeira, Leiria, célebre pelo seu estado eutrófico nos meses de verão. O organismo fitorremediador utilizado foi a microalga *Chlorella vulgaris*, imobilizada numa matriz de gel de alginato de cálcio. Foram recolhidas amostras de água da Lagoa, que, no momento da colheita, não apresentavam elevada concentração de nutrientes. Por forma a simular um ambiente eutrófico, as amostras de água foram enriquecidas com meio de cultura BBM2N (*Bold Basal Medium double nitrated*). O ensaio experimental decorreu ao longo de 12 dias, nos quais foi monitorizada a concentração de nitratos, nitritos, fosfatos, pH e temperatura. A concentração celular da biomassa de *C. vulgaris* foi avaliada no início e no final do ensaio, de modo a monitorizar o crescimento da microalga. As amostras de água enriquecidas com nutrientes, a remoção de nitratos atingiu 66,67%, 100% no caso dos nitritos e 77,67% para os fosfatos. Nestas amostras a densidade da microalga aumentou 4,6 vezes. Já nas amostras de água não enriquecidas, a percentagem total de remoção de fosfatos foi 96,00 %, mas não se verificou remoção de nitratos e nitritos. Nestas amostras ocorreu um aumento de 1,3 vezes na densidade da microalga. Concluiu-se que a remoção de nutrientes, por parte de *C. vulgaris* imobilizada, foi eficaz em água proveniente da Lagoa da Ervedeira, o que sugere que esta microalga tem potencial para aplicação como organismo fitorremediador.

<sup>1</sup> Escola Secundária Eng. Acácio Calazans Duarte (ESEACD), Marinha Grande, Leiria, Portugal.

\*marianass127@gmail.com;

\*\*mtarenta2007@gmail.com

**Palavras-chave**  
fitorremediação  
*Chlorella vulgaris*  
lagoa da Ervedeira  
eutrofização

**ISSN 1647-323X**

**Artigo em acesso aberto sob  
licença CC-BY**

© 2021 Autores

## INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural inestimável, sendo que o ser humano, desde cedo, percebeu a importância da qualidade da água potável. Porém, este recurso não é eterno: a sua conservação constitui um dos mais importantes pilares do desenvolvimento sustentável. A qualidade da água é uma preocupação fundamental no século atual, considerando-se a crescente escassez e a degradação de recursos, que atingiu níveis graves, causadas seja por atividades antrópicas, como, por exemplo, liberação de produtos químicos (Bertoni e Neto, 1990), seja por fenômenos naturais, como, por exemplo, o aquecimento global. A poluição das águas provoca desequilíbrios nos ecossistemas aquáticos, na saúde pública e no crescimento econômico. A poluição hídrica é uma ameaça à vida aquática e, por consequência, a toda a cadeia trófica. Quer pelo consumo de animais, como pelo consumo de produtos vegetais, a saúde do ser humano pode ser prejudicada devido à poluição aquática. É necessário diminuir a contaminação dos recursos hídricos através da prevenção e de tratamentos.

A melhoria da qualidade da água é uma questão central incluída na Agenda 2030, evidenciada através do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável nº 6, reconhecendo a importância da qualidade da água para o desenvolvimento sustentável da sociedade e a necessidade de enfrentar esse problema de forma global (Pacheco et al, 2020).

Os focos de poluição das águas provocam desequilíbrios nos ecossistemas aquáticos. A descarga de efluentes com elevada carga inorgânica, como o azoto e o fósforo, potencia o risco de eutrofização das massas de água (Barros, 2008). A eutrofização é um processo no qual a qualidade das massas de água se degrada devido ao aumento de efluentes com matéria orgânica (Smith et al, 1999), principalmente, azoto e fósforo (Sperling, 1996). Este aumento de nutrientes disponíveis provoca um crescimento excessivo das plantas aquáticas, algas, cianobactérias, dinoflagelados, entre outros, a níveis que podem interferir com a sobrevivência de outros organismos presentes no ambiente (Thomann & Mueller, 1987; Hecky & Kilham, 1988).

A eutrofização pode não só causar o desaparecimento de algumas espécies e o aparecimento de outras, como alterações de pH, cor e odor (Thomann & Mueller, 1987; Hecky & Kilham, 1988).

O processo de eutrofização pode ocorrer naturalmente ou ser induzido pelo homem. Quando ocorre de forma natural, o processo é lento, resultando na acumulação de nutrientes trazidos pelas chuvas e águas superficiais. Quando ocorre por ação antrópica, a entrada de nutrientes pode ter diferentes origens, como: esgotos domésticos, efluentes industriais ou atividades agrícolas (Esteves, 1998; Rocha et al, 2009).

A eutrofização é mais comum em lagos, devido à existência de estratificação vertical que permite mais facilmente o desenvolvimento de uma zona anóxica nos estratos inferiores. Contudo, também se pode verificar em rios (Hilton et al, 2006; Pimenta, 2012).

Os principais nutrientes responsáveis pelo crescimento da biomassa (algas e plantas) nos ecossistemas aquáticos são, como já referido, azoto e fósforo.

O azoto é um elemento imprescindível à vida, porém, quando a sua forma inorgânica (amoníaco, nitrato e nitrito) se encontra em excesso, pode causar, para além de eutrofização, acidificação da água e aumento da toxicidade (Camargo e Alonso, 2006; Verissimo, 2008; Pimenta, 2012). A concentração de nitratos ideal

deve ser inferior a 20 mg L<sup>-1</sup>, enquanto a concentração de nitritos deve ser inferior a 0,1 mg L<sup>-1</sup>. Na natureza, o fósforo é frequentemente o nutriente limitante e demarca o crescimento de outros seres vivos, principalmente em ecossistemas de água doce (Hecky & Kilham, 1988).

A concentração de fosfatos ideal numa massa de água doce é inferior a 1 mg L<sup>-1</sup>.

Para a recuperação de uma massa de água eutrofizada, a biorremediação constitui uma opção simples e de baixo custo (Vidali, 2001). Esta técnica permite a eliminação ou inativação de alguns poluentes, através de processos metabólicos de organismos vivos (Boopathy, 2000; Scragg, 2005; Abreu, 2013). Este processo é capaz de regenerar o equilíbrio do ecossistema original, enquanto que outras técnicas, como o transporte ou a contenção dos contaminantes, apenas movem o problema de local ou forçam a sua monitorização, em vez de o solucionarem. Apesar do potencial positivo da biorremediação, podem destacar-se alguns problemas: a utilização de aditivos para intensificar o desempenho do organismo biorremediador pode ser prejudicial para outros organismos que habitam o mesmo ambiente, quando feito *in situ* (Vidali, 2001); os produtos da biodegradação podem ter efeitos negativos no ambiente (Abreu, 2013) e pode ser um tratamento demorado.

Quando, no processo, são utilizadas algas, este é denominado como fitorremediação. Este é definido como a utilização de macro ou microalgas na eliminação ou transformação de contaminantes em águas que apresentam elevada carga orgânica (Pimenta, 2012; Abreu, 2013).

As microalgas são organismos importantes nos ecossistemas aquáticos e encontram-se na base da maioria das cadeias tróficas (Moreno-Garrido, 2008). As microalgas, ao contrário de outros microrganismos, como as leveduras, por exemplo, têm a vantagem de usar a luz solar para fixar o carbono atmosférico, reduzindo a sua dependência de açúcares para a fermentação, tendo, por isso, requisitos relativamente simples para o seu crescimento (Demirbas, 2009; Abreu, 2013). Desenvolvem-se facilmente em ambientes com disponibilidade intermitente e escassa de nutrientes, e várias estirpes de microalgas apresentam elevadas taxas de crescimento, e de reprodução, bem como uma reduzida emissão de gases com efeito estufa (Chisti, 2007 e Abreu, 2013). Assim, as microalgas apresentam um maior potencial biorremediador que as plantas, ou outros microrganismos (González et al, 1997; Bholá et al., 2014). Contudo, a eficiência de crescimento de algas e remoção de nutrientes depende de um grande número de variáveis: a composição do meio e as condições ambientais, a concentração inicial de nutrientes, a intensidade de luz, o ciclo de luz/escuridão e as espécies de algas (Lee et al, 2003; Alketife et al, 2007). Um exemplo da aplicação de microalgas, em contexto de biorremediação, é no tratamento biológico de águas residuais. Estes organismos são utilizados para remover nutrientes, como o azoto e fósforo, modelo que foi proposto há mais 50 anos por Oswald & Gotaas (1957), com resultados bastante positivos (Richmond, 2017; Oswald, 1988; Tam & Wong, 1995).

Contudo, o elevado custo da recolha dos organismos apresenta-se como a principal desvantagem à utilização de microalgas no tratamento de águas (Olguín, 2003; Pimenta, 2012). Uma solução para este problema consiste na imobilização das algas. Finda a fitorremediação, as microalgas podem ter várias aplicações, como no setor da agricultura, dos biocombustíveis, entre outros (Pimenta, 2012).

No presente estudo, foi escolhida a microalga verde *Chlorella vulgaris*, por ser facilmente cultivada em laboratório, altamente adaptável ao meio, e por necessitar apenas de dióxido de carbono, água, luz e baixas

concentrações de nutrientes (Safi et al., 2014; Abreu, 2013). A sua eficácia encontra-se já demonstrada em vários estudos como Abreu (2013) e Pimenta (2012).

O local em estudo foi a Lagoa da Ervedeira, situada no concelho de Leiria. Esta massa de água, de grande interesse para a Conservação da Natureza e classificada como Biótopo CORINE, é um lugar excelente para a invernada de aves migratórias, proporcionando-lhes abrigo, abundância de alimento e espaço para nidificação, criando-se um ecossistema natural de grande riqueza biológica (Oliveira et al, 2020). Para além de ser uma área muito procurada para fazer praia ou merendar, é também muito utilizada para a prática de pesca desportiva e de outras atividades, como a canoagem. Contudo, estas atividades e a sua utilização intensiva, podem contribuir para a sua degradação, tornando-se imperiosa a criação de regulamentação específica para o seu uso (Oliveira et al, 2020). Esta lagoa de água doce viu a sua paisagem afetada por incêndios florestais em 2017 e pela tempestade Leslie, em 2018. Encontra-se agora em franca reabilitação, permitindo o regresso da tranquilidade que a caracteriza. A água deste local apresenta níveis elevados de eutrofização na época de verão, agravada pelos focos de contaminação, associados às práticas agrícolas da região (Andrade, 2008).

O presente trabalho visou verificar o potencial biorremediador de *Chlorella vulgaris* para melhorar a qualidade da água da Lagoa da Ervedeira, preciosa massa de água, capaz de produzir o seu próprio microclima, constituindo-se numa arma eficaz no combate ao aquecimento global e à desertificação. *Chlorella vulgaris* foi cultivada com água da Lagoa e encapsulada em esferas de alginato de cálcio, de forma a verificar se a microalga é apropriada para o processo de biorremediação. Foi realizada a quantificação da percentagem de nitratos, nitritos e fosfatos, bem como a monitorização do crescimento da microalga, através de cálculos da densidade celular, por forma a avaliar a redução destes contaminantes e do nível de eutrofização.

## METODOLOGIA

### Saídas de campo e recolha das amostras

No dia 14 de março de 2021, foi efetuada a recolha de 2 amostras de água da Lagoa da Ervedeira, em 2 locais diferentes (Figura 1), de modo a analisar a qualidade da água antes de se proceder à recolha das amostras a utilizar na experiência. Foram efetuados testes colorimétricos a nitratos e nitritos da água nestes 2 locais, cujos resultados se encontram na Tabela I.

Estas 2 amostras foram descartadas, pois apenas foram utilizadas para caracterizar a concentração de nitratos e nitritos, de modo a perceber qual o melhor local para a recolha de amostras para os tratamentos com *Chlorella vulgaris*.



FIGURA 1: Locais de amostragem das 2 primeiras amostras do dia 14 de março de 2021, assinalados pelos círculos vermelhos. Fonte: Google Maps.

No dia 25 de abril de 2021, repetiu-se a amostragem, tendo sido efetuada a recolha de três amostras de água nos dois locais (Figura 2): duas de 6 L cada (coordenadas 39,932410, -8,896585, à profundidade de 0,5 metros) e uma de 4 L (coordenadas 39,930759, -8,897711, à profundidade de 1 metro). A saída de campo decorreu das 10h30 até às 13h00.

As amostras foram recolhidas com a ajuda de uma garrafa niskin, e foi utilizada uma sonda multiparamétrica para o registo de parâmetros gerais para caracterização da água (Tabela II). Foram também utilizados testes colorimétricos “Tetra test 6 in 1”, para a quantificação da concentração de nitratos e nitritos (Tabela III). A concentração de fosfatos foi determinada através dos testes colorimétricos “Salifert Phosphate Profi Test” (Tabela III). Ambos os kits foram usados para fazer as quantificações mencionadas, seguindo as instruções e os reagentes fornecidos. As amostras foram sujeitas, um dia após a recolha, a filtração, cujo objetivo foi eliminar o excesso de material em suspensão que poderia vir a ser depositado nas microalgas, dificultando a absorção de luz. As amostras foram posteriormente congeladas. No momento amostragem, a Lagoa da Ervedeira apresentava com um baixo nível de eutrofização, devido ao aumento da precipitação e às poucas horas de luz, características do mês de abril. Assim, procedeu-se ao enriquecimento das águas, de modo a reproduzir um estado eutrófico da Lagoa da Ervedeira nos meses de verão.

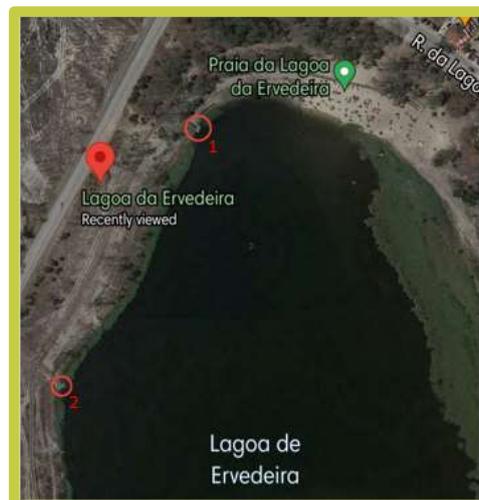


FIGURA 2: Localização do ponto de amostragem 1 (coordenadas 39,932410, -8,896585) e 2 (coordenadas 39,930759, -8,897711), assinalados pelos círculos vermelhos. Fonte: Google Maps.

### Enriquecimento das amostras recolhidas

As amostras foram deixadas a descongelar, até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, foram enriquecidos 3 L de água proveniente do Local 1, com o meio de cultura BBM2N - *Bold Basal Medium double nitrated* (composição expressa no Anexo I), que contém cerca de 15,13 mg L<sup>-1</sup> de azoto total e 59,86 mg L<sup>-1</sup> de fósforo total.

Foram testadas várias diluições (25%, 50% e 75%), porém, principalmente devido ao reduzido limite de deteção dos testes colorimétricos de fósforo (3 mg L<sup>-1</sup>), utilizou-se a diluição de 50% (500 mL de meio de cultura para 500 mL de água da Lagoa da Ervedeira). A água proveniente do Local 2 foi descartada, uma vez que a sua constituição nutricional era semelhante à água do Local 1.

### Cultivo da cultura-mãe

O inóculo da microalga *Chlorella vulgaris* (ACOI-879) foi adquirida na algoteca da Universidade de Coimbra e foi disponibilizado pelo Laboratório do Departamento de Algas Marinhas da Universidade de Coimbra.

O cultivo da cultura-mãe foi iniciado a 16 de abril de 2021, durante 10 dias, em meio de cultivo BBM2N. O fotoperíodo utilizado foi de 16h luz/8h escuro. A microalga foi cultivada em sistema descontínuo (*batch*), a uma temperatura de 25 ± 3° C, sob uma luz branca fluorescente, com uma intensidade luminosa de 5000 lux, num volume de 5 L e um fluxo contínuo de arejamento de 0.05 L min<sup>-1</sup>.

### Imobilização em alginato de cálcio e cálculo da densidade celular inicial

No dia 7 de maio de 2021, no laboratório de Algas Marinhas, da Universidade de Coimbra, procedeu-se à imobilização de *Chlorella vulgaris* em alginato, de forma a aumentar a sua eficiência na remoção de nutrientes sem prejudicar o seu crescimento (Mallick, 2002). A sua imobilização serviu também para impedir a libertação destes organismos na Lagoa, o que contribuiria para o processo de eutrofização.

Foi utilizada uma matriz de gel de alginato de cálcio para imobilizar as algas. O método de imobilização através de gel de alginato de cálcio é bastante popular, apresentando-se como uma metodologia promissora para a imobilização de células vivas. A principal vantagem dessa técnica é a simplicidade.

Para a imobilização, preparou-se uma solução de ácido algínico a 2,5% (dissolvendo 1,25 g de ácido algínico com 50 mL de água destilada) num agitador magnético com aquecimento; e uma solução de cloreto de cálcio a 4 % (dissolvendo 20 g de cloreto de cálcio com 500 mL de água destilada). Procedeu-se à mistura da cultura de *Chlorella vulgaris* com o ácido algínico, numa razão de 1:1 (50 mL da cultura de *Chlorella vulgaris* com o 50 mL ácido algínico). Esta suspensão foi agitada durante alguns minutos. De seguida, utilizando uma pipeta de 3 mL e abertura de 3 mm fez-se cair, gota a gota, a suspensão na solução de cloreto de cálcio, em agitação permanente. Este passo permitiu a formação e estabilização das esferas de alginato de 3 mm de diâmetro (Figura 3A). Das esferas de *Chlorella vulgaris* obtidas, foram utilizadas 600 (Figura 3B). Foram pesadas 100 esferas e, em média, cada esfera pesava  $0,025 \pm 0,001$  g. As esferas formadas foram conservadas em água destilada, no frigorífico, a 9°C, até à sua utilização.

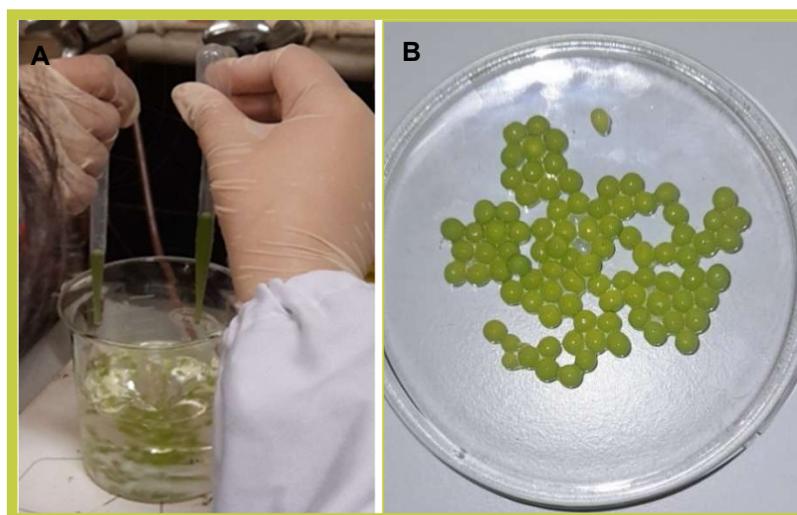


FIGURA 3: A. Precipitação da suspensão alginato – células algais na solução de cloreto de cálcio, em agitação permanente. B. Esferas de 3 mm de *Chlorella vulgaris* em matriz de alginato de cálcio.

De seguida, procedeu-se à contagem do número de células, em triplicado, o que obrigou a que as esferas tivessem de ser desagregadas. Para isso, cada esfera foi mergulhada em 10 mL de solução de citrato de sódio 2,5% agitando-se suavemente, durante 15 min. A contagem celular é foi realizada com recurso a uma câmara de Neubauer, sob observação no microscópio (Figura 4). Este procedimento foi, também, repetido no final da experiência, para o cálculo da densidade celular final.

Para calcular a densidade celular foi utilizada e a seguinte fórmula:

$$\text{densidade celular} = \frac{\text{valor médio de células} \times \text{diluição}}{\text{volume da quadrícula}}$$

A densidade média do inóculo inicial era  $1,71 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, em cada esfera.



FIGURA 4: Sequência de procedimentos para a contagem celular, realizada na câmara Neubauer: através de uma micropipeta, retirou-se 10 µl da solução de desagregação de 1 esfera de alginato de *Chlorella vulgaris* em citrato de sódio; colocou-se a diluição na câmara de Neubauer; colocação da câmara Neubauer na platina do microscópio ótico e visualização das células.

### Ensaio de biorremediação

Os materiais utilizados para o ensaio experimental foram: testes colorimétricos “Sera Quick Test 6 in 1”, de fitas, testes colorimétricos “Salifert Phosphate Profi Test”, de gotas e com uma margem de erro de 5 mg L<sup>-1</sup>, 9 balões de fundo plano de 1000 mL, 2 bombas de arejamento e tubagens, um termómetro, luzes e uma estrutura que permitiu o controlo da luminosidade.

O aparato experimental era constituído por nove balões de fundo plano de vidro de 1000 mL. Os nove balões de fundo plano foram divididos em 3 grupos de triplicados: A1-A3; B1-B3 e C1-C3 (Figura 5 e 6). A experiência em laboratório foi realizada durante o período de 12/05/2021 a 24/05/2021.



FIGURA 5: Aparato experimental.

Nos balões de fundo plano A, foram colocados 1000 mL de uma diluição de 50% de meio de cultura BBM2N e de água da Lagoa da Ervedeira e 100 esferas de *Chlorella vulgaris*, em cada balão; nos balões B, foram colocados 1000 mL da amostra de água da Lagoa da Ervedeira e 100 esferas de *Chlorella vulgaris*, em cada balão; os 3 balões C corresponderam aos recipientes de controlo, contendo cada um, 1000 mL da amostra de água recolhida. Os balões de fundo plano foram dispostos de acordo com a Figura 5, num laboratório da Escola Secundária Eng.º Acácio Calazans Duarte (ESEACD), Marinha Grande, Leiria, iluminados por lâmpadas LED de cor branca (6500 K) de 4 W de potência elétrica (LED T5 4W 0.3 m AIGOSTAR). Como o laboratório era bastante iluminado, os balões foram tapados com cartão, de modo a permitir o controlo da iluminação (Figura 7). Os balões foram submetidos a um fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro e ligados a duas bombas de arejamento. O arejamento leve permitiu reproduzir, o mais fielmente possível, as condições presentes na Lagoa da Ervedeira. Permitiu também oxigenar a água e manter as esferas de alginato em suspensão.

Em cada réplica foram medidos os seguintes parâmetros: nitratos, nitritos, fosfatos, pH e temperatura.

Uma vez que, ao 10º dia da experiência, ainda não tinha ocorrido uma elevada diminuição do valor de nitratos obtida pelos testes (devido à diluição escolhida de meio de cultura e água da Lagoa da Ervedeira) e como havia risco das *beads* rebentarem, após um longo tempo de assimilação de nutrientes, foram retiradas, de cada balão de fundo plano, 10 *beads* de *Chlorella vulgaris*. A experiência prosseguiu de igual forma, porém com apenas 90 *beads* em cada balão.

Ao 12º dia, foram feitas as testagens e retiradas, novamente, 10 *beads* e 2 mL de água de cada balão de fundo raso, de modo a descobrir se existiam microrganismos que pudessem toldar, de alguma forma, os resultados. No final deste dia, ocorreu bioincrustação na membrana de alginato de cálcio, devido ao

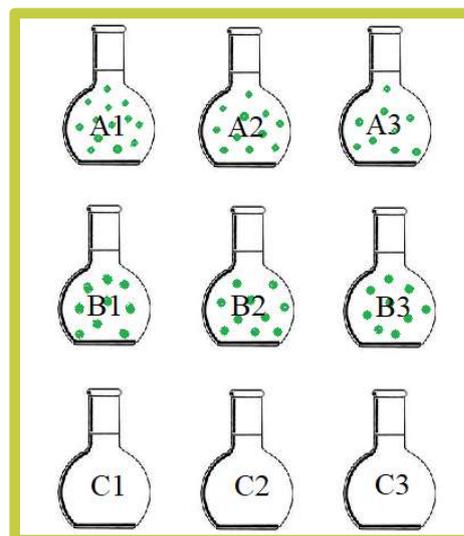


FIGURA 6: Ilustração da designação dos balões de fundo plano. Nos balões A1-A3 foi colocada água da lagoa enriquecida + microalgas; nos B1-B3 foi colocada água da lagoa + microalgas; e nos C1-C3 foi colocada apenas água da lagoa.



FIGURA 7: Aparato experimental que permite o controlo da luminosidade.

crescimento celular, resultando no alastramento de *Chlorella vulgaris* pelos balões. A experiência foi dada como terminada.

### Análise das amostras e análise estatística

O primeiro passo, após a montagem do aparato experimental foi, em cada ensaio, medir os valores dos parâmetros físico-químicos para o tempo 0. Quando a coloração dos testes colorimétricos não se assemelhava a um valor tabelado, mas a uma coloração intermédia, o valor médio entre valores tabelados foi tido em consideração. Este procedimento foi repetido a cada 48 horas, à exceção do 4º e 11º dias, devido à impossibilidade de deslocamento ao local onde se encontrava o sistema experimental.

As médias e desvios padrão dos valores e das concentrações dos diferentes parâmetros foram comparados separadamente para cada intervalo de tempo. O cálculo das médias, desvios padrão e percentagens de remoção, bem como os gráficos presentes neste trabalho foram feitos através do *software Microsoft Office Excel 2016*.

A taxa de crescimento (TC) médio das algas foi determinada de acordo com a equação:

$TC = \frac{\ln xf - \ln xi}{t}$ , onde,  $\ln xf$  é o logaritmo natural da densidade celular no final do ensaio,  $\ln xi$  é o logaritmo natural da densidade celular no início do ensaio e  $t$  é o período de duração do ensaio em dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização inicial das amostras

No dia 14 de março de 2021, foi efetuada a recolha de 2 amostras de água da Lagoa da Ervedeira, em 2 locais diferentes (Figura 1). Foram efetuados testes colorimétricos a nitratos e nitritos da água nestes 2 locais, cujos resultados se encontram na Tabela I. No dia 25 de abril de 2021, repetiu-se a amostragem, tendo sido efetuada a recolha de três amostras de água de dois locais (Figura 2). O registo de parâmetros gerais para caracterização da água encontra-se na Tabela II.

TABELA I: Resultados dos testes colorimétricos a nitratos e nitritos da água dos dois locais referenciados na Figura 1.

| Parâmetros                                         | Local 1 | Local 2 |
|----------------------------------------------------|---------|---------|
| Hora                                               | 13:46   | 13:53   |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> ) | 0       | 0       |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> ) | 0,14    | 0,17    |

TABELA II: Parâmetros medidos nas amostras de água dos dois locais, referenciados na Figura 2.

| Parâmetros                                | Local 1 | Local 2 |
|-------------------------------------------|---------|---------|
| Hora                                      | 10:39   | 11:08   |
| Temperatura (°C)                          | 18,2    | 18,6    |
| Oxigénio Dissolvido (%)                   | 87,5    | 86,2    |
| Oxigénio Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) | 8,23    | 8,05    |
| Condutividade (µs cm <sup>-1</sup> )      | 418,8   | 423,5   |
| Salinidade (Psu)                          | 0,23    | 0,23    |
| pH                                        | 7,45    | 7,63    |
| Potencial oxidação-redução (Mv)           | 245,3   | 250,6   |
| Turbidez (Fnu)                            | 2,81    | 3,07    |

Foram também utilizados testes colorimétricos “Tetra test 6 in 1”, para quantificação da concentração de nitratos e nitritos (Tabela III). A concentração de fosfatos foi determinada através dos testes colorimétricos “Salifert Phosphate Profi Test” (Tabela III).

TABELA III: Resultados dos testes colorimétricos a nitratos e nitritos da água dos dois locais referenciados na Figura 2.

| Parâmetros                                         | Local 1 | Local 2 |
|----------------------------------------------------|---------|---------|
| Hora                                               | 13:46   | 13:53   |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> ) | 0       | 0       |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> ) | 0,14    | 0,17    |

### Caracterização dos vários parâmetros durante o ensaio experimental: Temperatura e pH

A monitorização da temperatura e do pH permitiu calcular os valores médios e determinar se o cultivo decorreu em condições favoráveis ao crescimento. A Tabela IV apresenta os valores médios dos parâmetros para as condições observadas durante os ensaios.

TABELA IV: Valores de temperatura e pH registados nos ensaios. DP – desvio padrão.

| Tratamentos | T <sub>med</sub> (°C ± DP) | T <sub>min</sub> (°C) | T <sub>máx</sub> (°C) | pH <sub>med</sub> ± DP | pH <sub>min</sub> | pH <sub>máx</sub> |
|-------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| A           | 22,25 ± 0,69               | 21,00                 | 23,00                 | 7,36 ± 0,24            | 7,20              | 7,60              |
| B           | 21,58 ± 0,58               | 20,00                 | 22,00                 | 7,53 ± 0,20            | 7,20              | 7,60              |
| C           | 21,86 ± 0,56               | 20,00                 | 22,50                 | 7,53 ± 0,20            | 7,20              | 7,60              |

Relativamente à temperatura, os valores médios estavam em de acordo com o intervalo de temperaturas que se consideram ótimas para a maioria das espécies de microalgas: 16 a 27 °C, e apresentaram pouca variação, como pretendido.

No caso de *Chlorella vulgaris*, Converti et al. (2009) estudaram o efeito da temperatura no crescimento da mesma. Os autores testaram diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 38 °C) e concluíram que o crescimento é apenas influenciado, negativamente, quando a temperatura é superior a 30 °C. Logo, o intervalo de temperatura determinado neste projeto encontra-se incluído no intervalo considerado aceitável para o crescimento desta microalga.

Em relação ao pH, os valores médios registados variaram entre 7,2 e 7,6, o que está em conformidade com os valores apresentados por Barsanti e Gualtieri (2014). Estes últimos enunciaram que se a maioria das espécies de algas estiver num meio de pH superior a 9,0 ou inferior a 7,0, este não será propício ao seu crescimento. No entanto, Gong et al. (2014) avaliaram o efeito do pH no crescimento de *Chlorella vulgaris*: o intervalo testado variava entre 7 e 10 e os autores concluíram que o crescimento mais elevado foi obtido a um pH de 10. Contudo, sendo o objetivo do presente trabalho avaliar a capacidade biorremediadora de *Chlorella vulgaris* na remoção de azoto e fósforo, não faria sentido utilizar um pH tão alcalino, por não ser representativo das condições encontradas naturalmente na Lagoa da Ervedeira.

Ocorreu um aumento do pH, nos tratamentos A e B (Figura 8) no decorrer do crescimento algal. Tal era esperado, uma vez que o aumento da densidade celular das microalgas faz com que a atividade fotossintética reduza o teor de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo, aumentando, conseqüentemente, o pH (Bertoldi et al, 2007). O aumento deste parâmetro é muito importante no crescimento algal, levando à formação de gás de

amónia, tóxico para a microalga. Estudos revelam que a fotossíntese é inibida com concentrações de amónia acima de 28 mg L<sup>-1</sup>, em cultivos com pH excedente a 8,0 (Azov & Goldman, 1982).

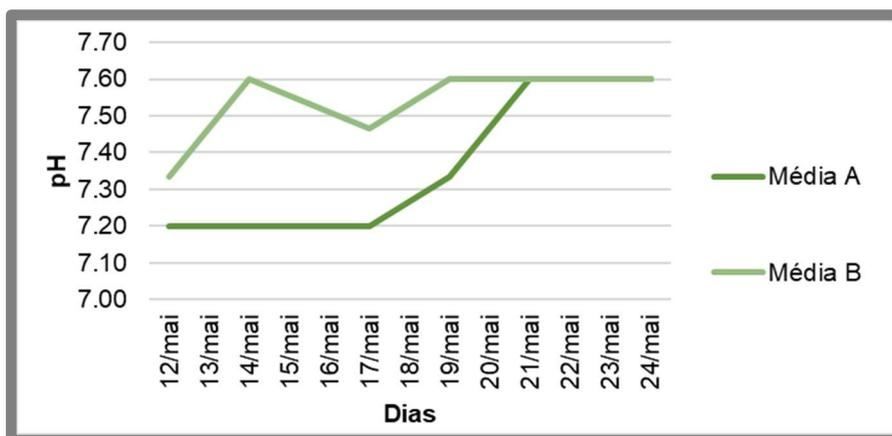


FIGURA 8: Variação do pH ao longo dos tratamentos.

### Caracterização dos vários parâmetros durante o ensaio experimental: Nitratos

Na Tabela V são apresentadas as concentrações de nitratos e respetivos desvios padrão, nos 2 tratamentos e nos controlos, no decorrer dos 12 dias.

Nos tratamentos A, que continham água da Lagoa da Ervedeira enriquecida, a concentração de nitratos diminuiu até aos (83,33 ± 11,79) mg L<sup>-1</sup>. Nos tratamentos B e nos controlos, a concentração inicial de nitratos era 0 mg L<sup>-1</sup> e assim se manteve ao longo da experiência. A Figura 9 apresenta a percentagem média de remoção de nitratos nos tratamentos e controlos.

TABELA V: Médias das concentrações e respetivos desvios padrão, dos nitratos (mg L<sup>-1</sup>), obtidos nos tratamentos A, B e C (controlo).

| Datas  | Tratamento A   | Tratamento B | Tratamento C |
|--------|----------------|--------------|--------------|
| 12/mai | 250,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |
| 14/mai | 250,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |
| 17/mai | 200,00 ± 35,36 | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |
| 19/mai | 150,00 ± 35,36 | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |
| 21/mai | 100,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |
| 24/mai | 83,33 ± 11,79  | 0,00 ± 0,01  | 0,00 ± 0,01  |

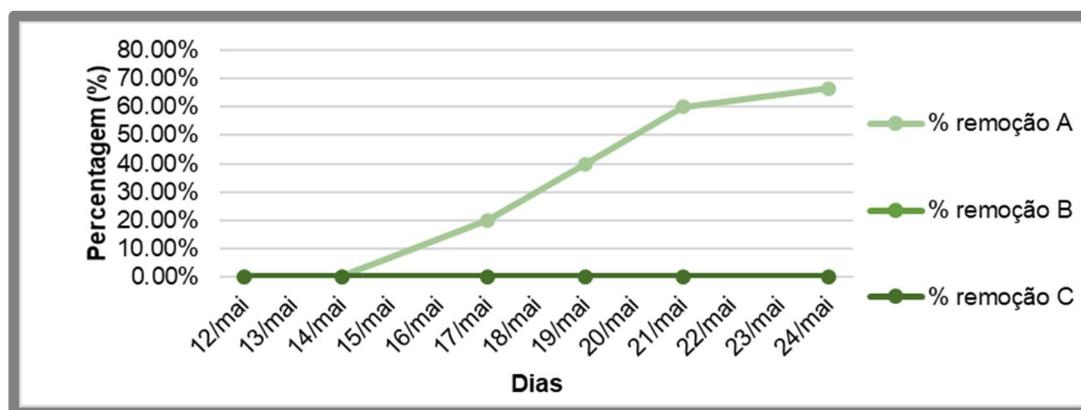


FIGURA 9: Percentagem média de remoção de nitratos nas 3 réplicas de cada tratamento e controlos.

Através da análise da Figura 9, observa-se que, nos tratamentos A e nas primeiras 2 a 3 dias, não há registo de diminuição da concentração de nitratos, o que poderá ter sido causado por uma elevada concentração de nitratos, superior ao limite dos testes colorimétricos. Assim, foi utilizado o valor máximo dos testes colorimétricos como valor inicial, visto que não existiam meios para determiná-lo efetivamente. Nas horas seguintes, os tratamentos A apresentaram diminuições na concentração de nitratos e ocorreu uma remoção média final de 66,76%, o que levaria a uma diminuição da eutrofização desta massa de água. Era esperada uma remoção de nitratos de 60 a 80%, nos primeiros 7 dias, tendo em conta a literatura (Méndez, 2003; Pimenta, 2012; Bertoldi et al, 2007), o que não ocorreu. Contudo, a microalga *Chlorella vulgaris* demonstrou, novamente, ser capaz de remover nitratos de um meio. Contudo, como era desconhecida a concentração inicial, é possível que a percentagem de remoção de nitratos tenha sido superior à medida. Foram removidos, em média, 166,67 mg L<sup>-1</sup> de nitratos do conjunto A.

A elevada concentração de nitratos nos tratamentos A não inibiu o crescimento da microalga. Este fenómeno é citado por Jeanfils, Cnisius e Burlion (1993): a assimilação de nitrato é dependente da atividade da enzima redutase (principal enzima responsável pela assimilação de azoto nas plantas), sendo que à medida que se aumenta a concentração de nitrato no meio, a atividade desta enzima aumenta e, consequentemente, a assimilação. Este facto é demonstrado no tratamento A, onde foi removidas 166,67 mg L<sup>-1</sup> de nitrato e onde se determinou uma densidade celular de 7,93×10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup> em cada esfera.

Os tratamentos B e os controlos não foram enriquecidos com meio de cultura, nem apresentavam concentração de nitratos detetável, por isso a concentração foi igual a 0 mg L<sup>-1</sup>. Como a concentração de nitratos inicial era 0 mg L<sup>-1</sup> e este valor se manteve ao longo da experiência, a percentagem de remoção é nula. Contudo, ocorreu crescimento algal, o que significa que a microalga *Chlorella vulgaris* assimilou os outros nutrientes existentes no meio, como os nitritos, os fosfatos, a amónia, entre outros. É de realçar que a interferência de outros microrganismos presentes na água pode, também, ter um papel na remoção de nitratos da água.

### **Caracterização dos vários parâmetros durante o ensaio experimental: Nitritos**

O azoto utilizado para o crescimento de microalgas pode encontrar-se na forma de amónia (NH<sub>3</sub>), nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Com a presença destes três elementos no meio, a microalga *Chlorella vulgaris* apresenta uma maior preferência pela amónia, seguida dos nitratos e, por fim, dos nitritos (Maestrini et. al, 1986; Barata, 2016). No entanto, visto que o excesso de amónia pode ser prejudicial à microalga, a sequência de assimilação destes elementos pode variar (Barsanti e Gualtieri, 2006; Barata, 2016). Estas conclusões são, porém, válidas para a generalidade de microalgas e a remoção de nutrientes pode variar dependendo da espécie utilizada (Cai et al, 2013).

À semelhança dos outros nutrientes medidos (nitratos e fosfatos), ocorreu a diminuição da concentração de nitritos no tratamento A. Os tratamentos B e C não foram enriquecidos com meio de cultura, nem apresentavam concentração de nitritos, inicialmente, logo os valores mantiveram-se nulos ao longo dos tratamentos. Contudo, ocorreu crescimento algal, o que indica que a microalga *Chlorella vulgaris* assimilou outros nutrientes presentes na água. Ao fim de dois dias, ocorreu uma diminuição nos valores de nitritos dos tratamentos A, tendo sido registados 0,00 mg L<sup>-1</sup> de nitritos a partir do dia 21 de maio de 2021. A Tabela VI apresenta os valores médios das concentrações de nitritos e respetivos desvios padrão, para cada

tratamento (A, B e C). A Figura 10 apresenta a percentagem média de remoção dos nitritos das réplicas de cada tratamento (A, B e C).

TABELA VI: Médias das concentrações e respetivos desvios padrão, dos nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ ), obtidos nos tratamentos A, B e C (controlo).

| Datas  | Tratamento A | Tratamento B | Tratamento C |
|--------|--------------|--------------|--------------|
| 12/mai | 1,00±0,01    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |
| 14/mai | 1,00±0,01    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |
| 17/mai | 0,67±0,47    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |
| 19/mai | 0,33±0,47    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |
| 21/mai | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |
| 24/mai | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    | 0,00±0,01    |

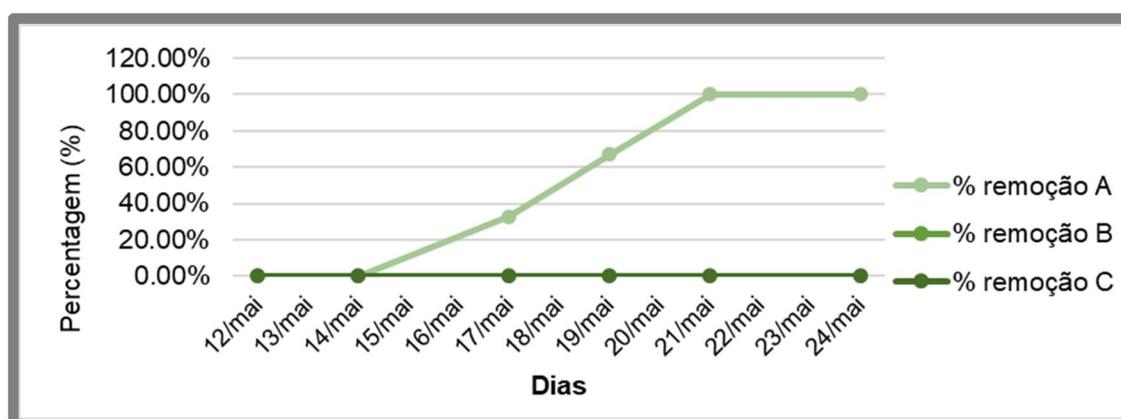


FIGURA 10: Percentagem média de remoção dos nitritos das réplicas de cada tratamento e controlos.

No tratamento A houve uma remoção aproximada de 100% dos nitritos. Contudo, a concentração de nitritos era relativamente baixa ( $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), quando comparada à concentração de nitratos ( $250,00 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esta remoção mostra que foi benéfico para a microalga recorrer tanto aos nitritos, como aos nitratos.

É de salientar que foram usados testes colorimétricos, relativamente pouco sensíveis para a deteção de pequenas quantidades de nutrientes, pelo que a remoção de nitritos poderá ter sido inferior a 100%. É também de sublinhar que a interferência de outros microrganismos presentes na água pode, também, ter um papel na remoção de nitritos da água.

### Caracterização dos vários parâmetros durante o ensaio experimental: Fosfatos

Nos primeiros 2 a 3 dias, não há registo de diminuição da concentração de fosfatos nos tratamentos A. Nos tratamentos B e nos controlos, há registo de uma diminuição da concentração de fosfatos, apesar de os controlos só possuírem água da Lagoa da Ervedeira, previamente filtrada e congelada. Nas horas seguintes, os tratamentos A já apresentaram diminuições na concentração de fosfatos, e no final dos 12 dias, a concentração de fosfatos diminuiu de  $3,00 \pm 0,00 \text{ mg L}^{-1}$  para  $0,67 \pm 0,24 \text{ mg L}^{-1}$ . Na Tabela VII, são apresentadas as médias das concentrações e respetivos desvios padrão, obtidos nos 2 tratamentos e nos controlos.

Nos tratamentos B e nos controlos, a concentração de fosfatos inicial era  $0,25 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$  e  $42 \pm 0,012 \text{ mg L}^{-1}$ , respetivamente. No final da experiência, a concentração era nula. Da análise da Figura 11, observa-se que, nos tratamentos A, nas 2 primeiras testagens, não ocorreu

TABELA VII: Médias das concentrações e respetivos desvios padrão, dos fosfatos ( $\text{mg L}^{-1}$ ), obtidos nos tratamentos A, B e C (controlo).

| Datas  | Tratamento A    | Tratamento B    | Tratamento C     |
|--------|-----------------|-----------------|------------------|
| 12/mai | $3,00 \pm 0,01$ | $0,25 \pm 0,01$ | $0,42 \pm 0,012$ |
| 14/mai | $3,00 \pm 0,01$ | $0,10 \pm 0,01$ | $0,15 \pm 0,07$  |
| 17/mai | $2,50 \pm 0,01$ | $0,05 \pm 0,01$ | $0,13 \pm 0,09$  |
| 19/mai | $2,50 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,01$ | $0,10 \pm 0,10$  |
| 21/mai | $1,00 \pm 0,01$ | $0,02 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,01$  |
| 24/mai | $0,67 \pm 0,24$ | $0,01 \pm 0,01$ | $0,02 \pm 0,01$  |

qualquer remoção de fosfatos. Contudo, no final da experiência ocorreu uma remoção de 77,67%. Nos tratamentos B, a percentagem total de remoção foi 96,00% e nos controlos foi 95,24%.

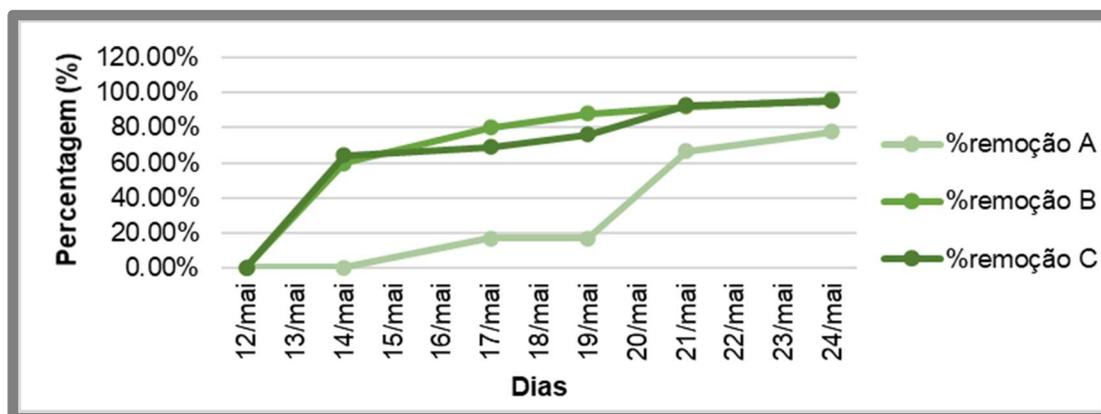


FIGURA 11: Percentagem média de remoção de fosfatos nas 3 réplicas de cada tratamento e controlos.

No caso da remoção de fosfatos, era esperada uma maior eficiência nas primeiras horas nos tratamentos A e B (onde foram utilizadas microalgas imobilizadas). De acordo com Lau et al. (1997), a microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada é capaz de atingir taxas de remoção de fosfatos de 99%, em três dias. No entanto, no tratamento A, a concentração de fosfatos era superior ao limite dos testes (por isso foi considerado como valor inicial o limite máximo dos testes colorimétricos ( $3 \text{ mg L}^{-1}$ )). Pode ter sido esta a razão para não se registar remoção de fosfatos nos primeiros 2 dias.

Outras possíveis causas para explicar as variações na percentagem de remoção ao longo das testagens podem ser:

- erros na metodologia de testagem;
- elevada margem de erro dos testes colorimétricos – 5 mg L<sup>-1</sup>;
- fatores físicos e fatores bióticos. O crescimento das algas e absorção de nutrientes são afetados pela disponibilidade de nutrientes, mas também dependem de interações complexas entre fatores físicos (pH e temperatura) e fatores bióticos. O fator biótico que influencia significativamente o crescimento de algas é a densidade: normalmente, quanto maior a densidade de algas, melhor será o crescimento e maior a eficiência na remoção. Contudo, a elevada densidade de algas pode conduzir ao auto-sombreamento, à acumulação de auto-inibidores e à redução na eficiência fotossintética (Abdel-Raouf et al., 2012);
- danificação da matriz de gel. Segundo Kaya & Picard (1995), as esferas poderiam colidir umas com as outras, perdendo alguma da sua integridade, levando à diminuição de uma parte da sua capacidade de remoção de fosfatos do meio.

Ocorreu uma remoção final de 2,33 mg L<sup>-1</sup>, 0,24 mg L<sup>-1</sup> e 0,4 mg L<sup>-1</sup> nos tratamentos A, B e C, respetivamente.

Note-se que a interferência de outros organismos presentes na água pode, também, ter um papel na remoção de fosfato. No estudo de de-Bashan et al. (2002), foi verificado que o fósforo não era removido quando a concentração de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> excedia os 20 mg L<sup>-1</sup>. Porém, ao contrário deste projeto, no estudo de de-Bashan et al. (2002), a água utilizada foi esterilizada, pelo que não existia a interferência de possíveis microrganismos externos. No presente estudo, a água não foi esterilizada, pelo que é possível que a diminuição dos níveis de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> se deva, também, à ação de organismos presentes na água da Lagoa. O facto de a concentração de fosfato ter diminuído nos controlos (sem a presença de algas imobilizadas) corrobora a teoria descrita acima.

De forma a confirmar esta hipótese, foram observadas 3 alíquotas de cada conjunto de balões, ao microscópio. De facto, para além de material inorgânico e invertebrados mortos, foi possível visualizar também material biológico fotossintético (Figura 12).

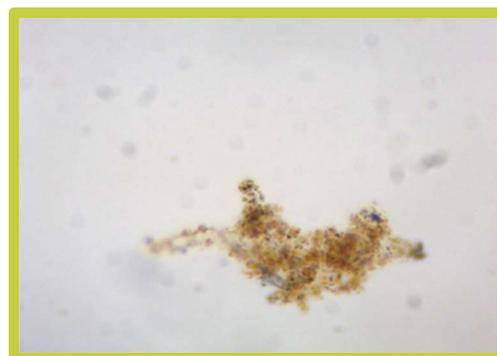


FIGURA 12: Material biológico fotossintético.

### **Caracterização dos vários parâmetros durante o ensaio experimental: Densidade celular da cultura**

No início do procedimento, cada cultivo foi inoculado com o mesmo volume e concentração de *Chlorella vulgaris*, assim obteve-se uma densidade celular inicial igual para todos os tratamentos (1,71x10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>). No final da experiência, voltou-se a proceder à medição da densidade celular para cada balão de fundo raso, em duplicados. Na Tabela VIII, encontra-se os resultados da contagem final e a respetiva variação. O tratamento C não foi incluído, uma vez que não possuía algas.

TABELA VIII: Densidade celular inicial, final e respetiva variação ao longo do procedimento.

| Tratamentos | Densidade celular inicial em cada esfera (células mL <sup>-1</sup> ) | Densidade celular final em cada esfera (células mL <sup>-1</sup> ) | Δ densidade (variação da densidade) - (células mL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| A           | 1,71x10 <sup>4</sup>                                                 | 7,93x10 <sup>4</sup> ± 3,8 × 10 <sup>3</sup>                       | 6,22 × 10 <sup>4</sup>                                            |
| B           | 1,71x10 <sup>4</sup>                                                 | 2,23x10 <sup>4</sup> ± 4,9 × 10 <sup>3</sup>                       | 5,20 × 10 <sup>3</sup>                                            |

No final dos ensaios, o tratamento A apresentou uma densidade celular de  $(7,93 \times 10^4 \pm 3,8 \times 10^3)$  células mL<sup>-1</sup>, logo ocorreu um aumento de 4,6 vezes em relação à densidade inicial. Já o tratamento B apresentou uma densidade celular de  $(2,23 \times 10^4 \pm 4,9 \times 10^3)$  células mL<sup>-1</sup>, ocorrendo um aumento de 1,3. A taxa de crescimento no tratamento A foi 0,1275 células mL<sup>-1</sup> por dia e no tratamento B foi 0,0216 células mL<sup>-1</sup> por dia.

O crescimento de *Chlorella vulgaris* nos tratamentos A e B (Tabela VIII) mostrou que a adaptação da microalga às soluções de água da Lagoa da Ervedeira + meio de cultura, e de água da Lagoa da Ervedeira, respetivamente, foi eficiente e bem-sucedida, uma vez que a densidade celular aumentou no decorrer dos 12 dias de cultivo.



## CONCLUSÃO

Os objetivos iniciais do presente trabalho assentavam na avaliação do crescimento de microalgas e na remoção de nutrientes de água proveniente da Lagoa da Ervedeira, enriquecida com meio de cultura BBM2N. Esta lagoa é popularmente conhecida pelos seus elevados níveis de eutrofização nos meses quentes.

A existência de 3 conjuntos de triplicados permite verificar: no tratamento A – o rendimento e adequabilidade no processo de biorremediação de água da Lagoa da Ervedeira enriquecida com meio de cultivo (de modo a reproduzir as concentrações dos nutrientes quando a mesma se encontra poluída), local onde, à partida, esta iria prosperar, visto que é o meio onde a mesma é cultivada; no tratamento B – a adaptação da alga à água da Lagoa da Ervedeira (sem adição de meio de cultura), com os seus microrganismos usuais e no tratamento C – permitir o controlo dos tratamentos A e B.

Estas conclusões são suportadas pelos dados da densidade celular (que mostram que a microalga é capaz de sobreviver e multiplicar-se nos meios utilizados), e pelos dados das taxas de remoção de nutrientes (que mostram a eficiência da microalga na assimilação de determinados nutrientes).

Através deste trabalho foi possível concluir:

1. A eficácia da *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de cálcio para remoção de nutrientes da água.
2. As elevadas percentagens de nutrientes removidos da água da Lagoa, indicam uma diminuição no nível de eutrofização da Lagoa da Ervedeira, caso esta tivesse ocorrido *in situ*. Este procedimento poderia enquadrar-se nas estratégias de limpeza e de gestão eco-eficientes da Lagoa da Ervedeira. Contudo, para avaliar apenas a percentagem de remoção de nutrientes por parte de *Chlorella vulgaris*, seria

necessário realizar um estudo com água esterilizada de modo a eliminar a influência de outros organismos nos resultados.

3. A existência de material biológico fotossintético na água indica que parte da percentagem de remoção de nutrientes possa também provir da capacidade de assimilação por parte de outros microrganismos.
4. O aumento da densidade celular nos tratamentos A durante os 12 dias de ensaio - de  $1,71 \times 10^4$  células/mL para  $7,93 \times 10^4$  células/mL - mostrou que a adaptação da microalga à solução de água da Lagoa da Ervedeira + meio de cultura foi eficiente e satisfatória.
5. Também o crescimento de *Chlorella vulgaris* nos tratamentos B mostrou que a adaptação da microalga à água da Lagoa da Ervedeira foi eficiente, uma vez que a densidade celular sofreu um aumento de 1,3 vezes.

O objetivo inicialmente proposto foi cumprido, mesmo tendo sido encontradas algumas dificuldades que se materializaram em várias repetições de testagens e desvios padrões um pouco elevados. Os principais parâmetros relacionados com a remoção de nutrientes e concentração celular foram determinados e comparados com valores reportados na literatura. Ao mesmo tempo, foi possível a determinação de parâmetros comparáveis com valores de referência, para a evolução das concentrações dos nutrientes, nomeadamente as taxas de remoção.

A poluição das águas é prejudicial a toda a vida na Terra e, por isso, é crucial efetuar tratamentos e processos de prevenção de contaminação deste recurso. O presente trabalho apresenta importância ecológica, uma vez que se materializa numa prova de que a fitorremediação é uma alternativa viável para a limpeza dos meios aquáticos, cuja conservação constitui um dos mais importantes pilares do desenvolvimento sustentável. Espera-se que, num futuro próximo, esta técnica, ou uma semelhante, seja posta em prática na Lagoa da Ervedeira, uma vez que esta massa de água apresenta uma grande importância para a comunidade Leiriense.

Considerando que a metodologia utilizada levou a alguns resultados inconclusivos, fazem-se sugestões para trabalhos futuros:

- Utilizar técnicas analíticas de maior precisão e sensibilidade, que permitam identificar e quantificar os nutrientes presentes, através de, por exemplo, sensores ou métodos espectrofotométricos, bem como a medição do oxigénio dissolvido.
- Que seja utilizada água proveniente da Lagoa da Ervedeira nos meses de verão, quando a eutrofização é mais elevada, e que seja feita a caracterização química e microbiológica das amostras. Caso não haja a possibilidade de utilizar amostras de água com um nível de eutrofização relevante, sugere-se o enriquecimento das amostras recolhidas com produtos agrícolas, uma vez que são a principal fonte de poluição da Lagoa, ou então proceder à recolha de amostras na zona Este da Lagoa, junto aos campos agrícolas.
- Que se utilize uma metodologia que permita evitar o sombreamento das células, de forma a maximizar a remoção de nutrientes, como por exemplo, o uso de esferas de diâmetro menor (o que iria diminuir o número de dias de biorremediação antes de se observar bioincrustação na membrana).

- A avaliação do comportamento da cultura em ambiente exterior deve ser efetuada uma vez que a variabilidade diária e sazonal da temperatura e intensidade luminosa tem uma forte influência nas taxas de crescimento da microalga e conseqüentemente na remoção dos nutrientes.

Aquando da experiência em campo, podem ser utilizadas gaiolas de tela plástica, onde serão colocadas as esferas de *Chlorella vulgaris* imobilizadas, após um processo de limpeza e triagem. As gaiolas devem ser fixadas a duas estacas presas a estruturas de flutuação, posicionadas perto da superfície. Esta técnica já se mostrou eficiente e encontra-se descrita na literatura (Costa, 2006).

---

**agradecimentos** • Chegar até esta fase não seria possível sem o auxílio, boa vontade e colaboração de várias pessoas. Por este motivo agradecemos, desde já, a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão do presente trabalho. À professora Teresa Mouga, à Dr.<sup>a</sup> Joana Pereira, à Dr.<sup>a</sup> Tânia Vidal por toda a incansável ajuda, paciência, estima e orientação dada para melhorar o nosso trabalho e por todo o conhecimento que, brilhantemente, partilharam connosco. Em particular, à Dr.<sup>a</sup> Diana Pacheco, pela disponibilidade e pelo auxílio, atenção, apoio, ensinamentos e simpatia que nos ofereceu, e à equipa do Departamento de Algas Marinhas da Universidade de Coimbra pelos recursos disponibilizados e por toda a ajuda prestada no tratamento de análises e saída de campo. Agradecemos, de igual modo, a todos os membros da equipa de investigadores com quem tivemos o prazer de trabalhar no laboratório. Em especial aos nossos pais e aos nossos avós, que alimentaram todos os nossos sonhos e ideias, que, nas horas difíceis, sempre nos protegeram e apoiaram com todo o amor que lhes é característico e que nos guiaram e acompanharam a todos os locais necessários a este projeto. Os agradecimentos estendem-se à Dr.<sup>a</sup> Telma Fontes, do Centro de Interpretação Ambiental de Leiria, e ao Eng. Rui Andrade, da Administração da Região Hidrográfica do Centro, por todos os contributos, frases de ânimo que nos dirigiram. Por fim, e igualmente importante, ao nosso professor Rui Fernandes, por nos ter incentivado a desenvolver um projeto e pela assistência que nos forneceu, e ao professor Rogério Nogueira, do Agrupamento Marinha Grande Poente, pelo apoio e interesse que manifestou para com o nosso projeto.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
- Abreu LCFG (2013). Biorremediação de fosfatos e ferro: Utilização de *Chlorella vulgaris* imobilizada em alginato de sódio. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, Porto, 45 pp.
- Alketife A, Judd S, Znad H. (2017). Synergistic effects and optimization of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and nutrient uptake of a freshwater *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology* 38: 94-102.
- Andrade R (2008). Caracterização da Hidrodinâmica da Lagoa da Ervedeira e a sua relação com o Aquífero Superior. Tese de Mestrado. Universidade de Coimbra, Coimbra, 116 pp.
- Azov Y, Goldman JC (1982). Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 735.
- Barata AFL (2016). Microalgas: produção econômica e ambientalmente sustentável. Dissertação de Doutoramento. Universidade de Lisboa, Lisboa, 99pp.
- Barros ADL (2008). Aplicação do modelo Moneris à bacia hidrográfica do rio Ipojuca. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 193 pp.
- Barsanti L, Gualtieri P (2014). Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology: Behin, J. (2012). Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of Merox unit as pulping liquor. *Chemical Engineering Research and Design* 90: 1045- 1051.
- Bertoldi FC, Sant'Anna E, Oliveira JLB, Rebelo AM (2007). Biorremoção de nitrogênio e fósforo da solução hidropônica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. *Evidência* 7: 85-92.
- Bertoni J, Lombardi NF (1990). Conservação do solo. São Paulo: Ícone, 1990. 355 p.
- Bhola V, Swalaha F, Kumar RR, Singh M, Bux F. (2014). Overview of the potential of microalgae for CO<sub>2</sub> sequestration. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11: 2103-2118.

- Boopathy R (2000). Factors limiting bioremediation Technologies. *Bioresource Technology* 74: 63-67.
- Cai T, Park SY, Li Y (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 19: 360-369.
- Camargo J, Alonso A (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International* 32: 831-849.
- Catarino SRM (2016). Biorremediação. Monografia. Universidade de Coimbra, Coimbra, 28 pp.
- Chisti Y (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances* 25: 294-306.
- Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48: 1146-1151.
- Costa VMFD (2006). Utilização da macroalga *Ulva lactuca linnaeus* na redução de nutrientes (NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>- e PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) provenientes da carcinicultura. Dissertação de pós-graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 69 pp.
- De-Bashan LE, Moreno M, Hernandez JP, Bashan Y (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water research* 36: 2941-2948.
- Demirbas A (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy conversion and management* 50: 14-34.
- Esteves FDA (1998). *Fundamentos de limnologia*. Interciência, Rio De Janeiro, 2ª Ed, 575p.
- Gong Q, Feng Y, Kang L, Luo M, Yang J (2014). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia* 61: 2012-2015.
- González LE, Cañizares RO, Baena S (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource technology* 60: 259- 262.
- Gualtieri P, Barsanti L (2006). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC press.
- Hecky RE, Kilham P (1988). Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment 1. *Limnology and oceanography* 33: 796-822.
- Hilton J, O'Hare M, Bowes MJ, Jones JI (2006). How green is my river? A new paradigm of eutrophication in rivers. *Science of the Total Environment* 365: 66-83.
- Kaya VM, Picard G (1995). The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity. *Biotechnology and bioengineering* 46: 459-464.
- Lau PS, Tam NFY, Wong YS (1997). Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology* 18: 945-951.
- Lee JS, Lee JP (2003). Review of advances in biological CO<sub>2</sub> mitigation technology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8: 354.
- Maestrini SY, Robert JM, Leftley JW, Collos Y (1986). Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. *Journal of experimental marine Biology and Ecology* 102: 75-98.
- Mallick N (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *Biomaterials: An International Journal On The Role Of Metal Ions In Biology, Biochemistry, And Medicine* 15: 377-390.
- Méndez M (2003). Evaluación de la remoción de fósforo y nitrógeno de aguas residuales por el alga *Chlorella* sp. *Revista Clon* 2: 42-46.
- Moreno-Garrido I (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource technology* 99: 3949-3964.
- Olguín EJ (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology advances* 22: 81-91.
- Oliveira M, Santos O, Delgado R, Duarte S (2020). Lagoa da Ervedeira... Conhecer para preservar. E-book OIKOS.
- Oswald WJ, Gotaas, HB (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of the American Society of Civil Engineers* 122: 73-105.
- Oswald WJ (1988). Micro-algae and wastewater treatment. Micro-algal Biotechnology, Cambridge Univ. Press, Borowitzka, M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.), New York: 357-394.
- Pacheco D, Rocha A, Pereira L, Verdelhos T, (2020). Microalgae Water Bioremediation: Trends and Hot Topics. *Applied Sciences* 10: 1886.
- Pimenta S (2012). Comparação entre a biorremediação de água natural e água residual utilizando *Chlorella vulgaris*, Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, Porto, 52 pp.

- Rocha SA, Louçon MS, de Oliveira Garcia G (2009). Influência de diferentes fontes de poluição no processo de eutrofização. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 4: 1.
- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265-278.
- Scragg AH (2005). Environmental biotechnology, 1ª Ed. New York: OXFORD University Press.
- Smith VH, Tilman GD, Nekola JC (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution* 100: 179-196.
- Thomann RV, Mueller JA (1987). *Principles of surface water quality modeling and control*. Harper & Row Publishers.
- Veríssimo ARA (2008). Avaliação da comunidade microbiana diazotrófica em solos sob cultura biológica por métodos moleculares. Dissertação de Mestrado. Universidade do Algarve, Faro, 85 pp.
- Vidali M (2001). Bioremediation. an overview. *Pure and applied chemistry* 73: 1163-1172.
- Von Sperling M (1996). *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos (Vol. 1)*. Editora UFMG.

## WEBGRAFIA

- [Chlorella vulgaris - an overview | ScienceDirect Topics](#) Acedido a 13 de abril de 2021.
- [Efeitos da poluição da água: consequências da poluição da água \(plasticcollectors.com\)](#) Acedido a 10 de abril de 2021.
- [Ficorremediação de efluentes industriais | Portal Tratamento de Água Tratamento de Água \(tratamentodeagua.com.br\)](#) Acedido a 6 de abril de 2021.
- <https://www.visiteleiria.pt/pontos-de-interesse/patrimonio-natural/Lagoa-da-ervedeira/> Acedido a 20 de abril de 2021.
- <https://jra.abae.pt/plataforma/artigo/os-guardioes-da-Lagoa-da-ervedeira/> Acedido a 20 de abril de 2021.
- <https://www.ods.pt/objectivos/6-agua-e-saneamento/?portfolioCats=24> Acedido a 15 de maio de 2021.
- <https://botany.natur.cuni.cz/algo/caup-media.html#BBM>. Acedido a 30 de maio de 2021.

## Anexo I - Constituição do meio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) with double nitrate

Para aproximadamente 900 mL de água destilada, adiciona-se:

| <b>Volume (mL)</b> | <b>Solução</b>                                      | <b>Concentração (g/400 mL H<sub>2</sub>O)</b> |
|--------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 20                 | NaNO <sub>3</sub>                                   | 10                                            |
| 10                 | CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O               | 1                                             |
| 10                 | MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O               | 3                                             |
| 10                 | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O | 3                                             |
| 10                 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 7                                             |
| 10                 | NaCl                                                | 1                                             |

De seguida, adiciona-se 1 mL das seguintes soluções:

| <b>Soluções</b>                                                                     | <b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Solução 1 (B)</b>                                                                |                                        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                                      | 11,42                                  |
| <b>Solução 2 (H – Fe)</b>                                                           |                                        |
| FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                                               | 4,98                                   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.                                                | 1 ml                                   |
| <b>Solução 3 (H5)</b>                                                               |                                        |
| ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O                                               | 8,82                                   |
| MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O                                               | 1,44                                   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> . 4H <sub>2</sub> O | 0,88                                   |
| CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O                                               | 1,57                                   |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                               | 0,49                                   |
| <b>Solução 4 (EDTA)</b>                                                             |                                        |
| EDTA                                                                                | 50                                     |
| KOH                                                                                 | 31                                     |

Finalmente, o volume da solução deve ser igualado a 1000 ml com água destilada.