



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL  
CENTRO DE TECNOLOGIA - CTEC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
HÍDRICOS E SANEAMENTO



JOYCE CAMILA BARBOSA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS CONTAMINANTES EM  
SISTEMA ABERTO DE TRATAMENTO DE SORO DO LEITE POR MICROALGAS**

Maceió

2023

JOYCE CAMILA BARBOSA DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS CONTAMINANTES EM  
SISTEMA ABERTO DE TRATAMENTO DE SORO DO LEITE POR MICROALGAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva

Maceió

2023

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586i Silva, Joyce Camila Barbosa da.  
Identificação de fungos filamentosos contaminantes em sistema aberto de tratamento de soro do leite por microalgas / Joyce Camila Barbosa da Silva. – 2023.  
59 f. : il. color.

Orientador: Carlos Eduardo de Farias Silva.  
Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2023.

Bibliografia: f. 53-59.

1. Identificação molecular. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. Biodegradação ambiental. 4. Microalgas-Fungos. 5. Simbiose. I. Título.

CDU: 579.262



## Folha de Aprovação

JOYCE CAMILA BARBOSA DA SILVA

### IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS CONTAMINANTES EM SISTEMA ABERTO DE TRATAMENTO DE SORO DO LEITE POR MICROALGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos e Saneamento.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA  
Data: 09/10/2023 10:48:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Em: 04 /10 /2023

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva  
(Orientador - PPGRHS/ CTEC/UFAL)

#### Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** KARINA RIBEIRO SALOMON  
Data: 09/10/2023 15:48:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Karina Ribeiro Salomon  
(Examinador Interno – PPGRHS/ CTEC/UFAL)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ALBANISE ENIDE DA SILVA  
Data: 09/10/2023 14:19:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Albanise Enide da Silva  
(Examinadora Externa ao Programa –UFAL)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ANA KARLA DE SOUZA ABUD  
Data: 09/10/2023 11:32:39-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Ana Karla de Souza Abud  
(Examinadora Externa à Instituição –UFS)

## RESUMO

O descarte inadequado de efluentes provindos das unidades fabris de indústrias de laticínios podem degradar o meio ambiente devido ao alto teor de poluentes presentes no soro do leite. Dessa forma, é necessário o tratamento prévio desse efluente antes do lançamento em corpos d'água, porém, os tratamentos físico-químicos geralmente aplicados para esse tipo de efluente são altamente onerosos tornando-se inviável para as indústrias de pequeno e médio porte. Nesse contexto, os processos biológicos ganham destaque devido à simplicidade de sua aplicação e viabilidade econômica. Em comparação com as estratégias tradicionais de tratamento biológico, o uso de microalgas tem vantagens como maior capacidade de consumo de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, e são geralmente cultivadas em sistema aberto, o qual tem alto risco de contaminação por outros grupos microbiológicos. À vista disso, a relação simbiótica entre algas e fungos ganham destaque pois essa associação facilita a colheita de algas, copeletizando-as em pellets de fungos o que pode aumentar a eficiência do tratamento. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar fungos filamentosos isolados durante o processo de tratamento terciário de soro do leite por microalgas da espécie *Tetrademus obliquus* LCE-01 em sistema aberto. O sistema de tratamento por *T. obliquus* LCE-01 foi composto por reatores abertos utilizando efluente residual com cargas orgânicas (Demanda Química de Oxigênio) entre 1000-4000 mg L<sup>-1</sup>, agitados magneticamente, durante 15 dias de processo, mantidos a 30-35°C e pH 7,5-8,0 com iluminação lateral de 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. As amostras do reator foram coletadas após vigoroso crescimento microbiano no reator (log UFC mL<sup>-1</sup> entre 9-10) e inoculadas por espalhamento em placas de Petri com meio BDA (batata dextrose agar) em diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup>, de forma a favorecer o crescimento de colônias isoladas. Conseguiu-se isolar 9 cepas fúngicas, que após algumas gerações de repiques só 5 mantiveram viabilidade para cultivo em laboratório (F2, F4, F5, F6 e F10), as quais foram utilizadas para as etapas de caracterização a nível macro e micromolecular, sendo possível encontrar o gênero das cepas especificamente, *Cladosporium*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Chrysosporium* e *Penicillium*, respectivamente. A caracterização molecular preliminar foi realizada seguindo as seguintes etapas de extração do DNA e amplificação do DNA fúngico utilizando os *primers* ITS (Internal Transcript Spacer) (1 e 4) e beta-tubulina (β-tub ou BT) (2a, 2b, T1 e T2), que foi eficaz, e poderá seguir sequenciamento para a inferência de árvores filogenéticas e depósito em *databases*.

**Palavras-chave:** identificação molecular, PCR, biorremediação, microalga-fungo, simbiose

## ABSTRACT

Inadequate disposal of effluents from dairy manufacturing units can degrade the environment due to the high level of pollutants present in whey. Therefore, it is necessary to pre-treat this effluent before releasing it into water bodies, however, the physical-chemical treatments generally applied to this type of effluent are highly expensive, making it unfeasible for small and medium-sized industries. In this context, biological processes gain prominence due to the simplicity of their application and economic viability. Compared to traditional biological treatment strategies, the use of microalgae has advantages such as greater nutrient consumption capacity, mainly nitrogen and phosphorus, and they are generally cultivated in an open system, which has a high risk of contamination by other microbiological groups. In view of this, the symbiotic relationship between algae and fungi is highlighted as this association facilitates the harvesting of algae by copelletizing them into fungus pellets, which can increase the efficiency of the treatment. Therefore, the present work aims to characterize filamentous fungi isolated during the tertiary treatment process of whey by microalgae of the species *Tetradesmus obliquus* LCE-01 in an open system. The treatment system for *T. obliquus* LCE-01 was composed of open reactors using residual effluent with organic loads (Chemical Oxygen Demand) between 1000-4000 mg L<sup>-1</sup>, magnetically stirred, during 15 days of process, maintained at 30-35°C and pH 7.5-8.0 with lateral illumination of 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The reactor samples were collected after vigorous microbial growth in the reactor (log CFU mL<sup>-1</sup> between 9-10) and inoculated by spreading in Petri dishes with PDA medium (potato dextrose agar) in dilutions 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-6</sup>, in order to favor the growth of isolated colonies. It was possible to isolate 9 fungal strains, of which, after a few generations of breeding, only 5 remained viable for cultivation in the laboratory (F2, F4, F5, F6 and F10), which were used for the characterization steps at the macro and micromolecular level, being It is possible to find the genus of the strains specifically, *Cladosporium*, *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Chrysosporium* and *Penicillium*, respectively. Preliminary molecular characterization was carried out following the steps of DNA extraction and amplification of fungal DNA using the primers ITS (Internal Transcript Spacer) (1 and 4) and beta-tubulin (β-tub or BT) (2a, 2b, T1 and T2), which was effective, and can be sequenced for inferring phylogenetic trees and depositing them in databases.

**Key-words:** molecular identification, PCR, bioremediation, microalga-fungus, symbiosis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Método da diluição com o espalhamento para isolamento dos fungos.....	36
Figura 2 - Aspecto de diferentes colônias fúngicas sendo a) algodonoso, b) coriáceo, c) pulveruleno e d) aveludado.....	37
Figura 3 - Exemplos de características morfológicas das colônias .....	37
Figura 4 - Características Microscópicas de diferentes fungos .....	38
Figura 5 – Características macro e microscópicas do micélio do fungo F2.....	45
Figura 6 - Características macro e microscópicas do fungo F4.....	46
Figura 7 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F5. ....	47
Figura 8 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F6. ....	48
Figura 9 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F10 . ....	49
Figura 10 - Eletroforese em gel do DNA extraído dos fungos isolados.....	50
Figura 11 – Amplicons obtidos a partir da amplificação por PCR do DNA dos isolados utilizando os primers ITS 1 e 4 (a), BT 2a e 2b (b) e BT T1 e T2 (c).....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos efluentes da indústria de laticínios .....	14
Tabela 2 - Componentes dos diferentes tipos de soro do leite .....	16
Tabela 3 - Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes aos fungos filamentosos.....	43
Tabela 4 - Descrição das concentrações para o PCR.....	44

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E SORO DO LEITE.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>	
<b>3.1</b>	<b>Indústria do leite</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Produção e características do soro do leite</b> .....	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>Processos de tratamento biológico do soro do leite</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>MICROALGAS</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Características biológicas</b> .....	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Cultivo de microalgas em sistema aberto e fechado</b> .....	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Tipo de biorreatores usados para o cultivo de microalgas</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4</b>	<b>Microalgas para tratamento de efluentes</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>FUNGOS FILAMENTOSOS</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1</b>	<b>Características biológicas</b> .....	<b>29</b>
<b>5.2</b>	<b>Fungos filamentosos no tratamento de efluentes</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3</b>	<b>Simbiose entre microalgas e fungos filamentosos no tratamento de efluentes</b> ...	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS</b> 34	
<b>6.1</b>	<b>Método da diluição seriada e técnica de espalhamento em meios de cultura</b> .....	<b>35</b>
<b>6.2</b>	<b>Caracterização macro e microscópica</b> .....	<b>36</b>
<b>6.3</b>	<b>Caracterização molecular (genética)</b> .....	<b>38</b>
<b>7</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>Microalga utilizada e sistema de tratamento</b> .....	<b>41</b>
<b>7.2</b>	<b>Isolamento dos fungos filamentosos</b> .....	<b>41</b>
<b>7.3</b>	<b>Caracterização macro e microscópica</b> .....	<b>42</b>
<b>7.4</b>	<b>Caracterização molecular preliminar das cepas fúngicas</b> .....	<b>42</b>
<b>7.4.1</b>	<b>Extração de DNA</b> .....	<b>42</b>
<b>7.4.2</b>	<b>Amplificação e sequenciamento do DNA</b> .....	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>8.1</b>	<b>Características macro e microscópicas das espécies fúngicas</b> .....	<b>45</b>
<b>8.1.1</b>	<b>Identificação do fungo F2</b> .....	<b>45</b>

8.1.2	Identificação do fungo F4.....	46
8.1.3	Identificação do fungo F5.....	47
8.1.4	Identificação do fungo F6.....	48
8.1.5	Identificação do fungo F10.....	49
<b>8.2</b>	<b>Caracterização molecular preliminar .....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço das atividades industriais, a contaminação nos corpos hídricos tem se intensificado por consequência do despejo de efluentes indevidamente tratados nesses cursos d'água (SOUSA et al., 2021). Entretanto, o poder público estabelece padrões para o lançamento desses efluentes na natureza, bem como estimula o estudo de meios pelos quais pode-se garantir o seu cumprimento (LOBO et al., 2021). No Brasil, a Resolução CONAMA nº 430/2011 normatiza esses parâmetros e expõe os limites legais de características físicas e químicas dos efluentes. Dessa forma, o estudo de métodos para tratamento de efluentes é de extrema importância para o cumprimento das normas vigentes através da adoção de atividades industriais cada vez mais sustentáveis (AZEVEDO et al., 2020).

Nesse sentido, os processos biológicos ganham visibilidade uma vez que esse tratamento é uma alternativa econômica e eficiente que utiliza do metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes (CAROLIN, 2017; MOHSENPOUR, 2021). Dentre as alternativas de tratamento biológico, as microalgas vêm ganhando espaço por serem microrganismos fotossintéticos capazes de armazenar energia solar, convertendo-a em energia biológica. Destacam-se por seu crescimento rápido, cultivo simples e sua biomassa rica em vitaminas, proteínas e ácidos graxos que pode ser destinada para fins de interesse alimentar, farmacêutico, cosméticos e químico (CHEW et al., 2017).

Os métodos para cultivo das microalgas diferem entre sistemas abertos e fechados, principalmente, e o êxito do seu cultivo e produtividade em larga escala depende de vários fatores, dentre eles o crescimento rápido, a boa capacidade de sedimentação além de apresentar característica como elevada concentração de óleos e ácidos graxos saturados (WAYNE et al., 2018). Em relação ao sistema de cultura pode ser de forma suspensa, composta por culturas mistas de microalgas que se desenvolvem de forma natural, podendo se desenvolver em lagoas abertas.

Nos sistemas abertos ou *open pond* o tipo de produção mais utilizado na prática são as lagoas abertas que tem como principal benefício o baixo custo, o uso de energia solar e pouca necessidade de energia mecânica para que haja a mistura (BALDEV et al., 2018). Por ser um sistema de simples operação, o tratamento em taque aberto é utilizado no cultivo de microalgas por permitir que o meio seja contaminado com alguns tipos de microrganismos que atuam, na maioria das vezes, no favorecimento do processo. Dentre esses contaminantes estão os fungos, organismos heterotróficos adequados para a absorção biológica de minerais e para o tratamento

biológico de poluentes de águas residuais industriais graças a sua capacidade de degradar a matéria orgânica presente no meio.

Em sistemas fechados os tipos de fotobiorreatores mais usuais são os de tubo vertical, horizontal ou de tela plana. Dentre as vantagens dos fotobiorreatores em detrimento dos sistemas abertos são o controle da temperatura, pH, circulação da efluente e maior proteção contra contaminação da cultura (LING et al., 2019). Porém, suas desvantagens são a acumulação tóxica de oxigênio (O<sub>2</sub>), custos elevados do equipamento e da operação, além do superaquecimento e das incrustações biológicas nas paredes (TAN et al., 2018; FULBRIGHT et al., 2018; WAYNE et al., 2018; PIEROBON et al., 2018).

Por outro lado, os fungos filamentosos, como seres quimioheterotróficos, emitem dióxido de carbono enquanto as algas são consumidoras desse elemento e produtoras de oxigênio o qual é utilizado para desenvolvimento dos fungos. A correlação entre as duas espécies é considerada vantajosa porque garante mais resistência aos microrganismos permitindo que ambas trabalhem para o melhor rendimento ao processo (MOREIRA, 2015). A interação microalga-fungo, é evidenciada em vários estudos em razão da relação sinérgica que ocorre entre eles, favorecendo o crescimento de ambos e assim otimizando o processo de biorremediação (FARHAN; ABID; DELLAS, 2022; LAM et al., 2018).

Nesse contexto, é promissor o estudo de fungos filamentosos contaminantes presentes no soro do leite durante seu tratamento em sistema aberto para entender sua relação com a microalga presente visando assim a otimização deste processo. Portanto, presente trabalho terá como objetivo avaliar o tratamento de soro de leite em sistema aberto inoculando-se microalgas ao passo que se verifica a contaminação existente por fungos filamentosos no tratamento, quantificando-os, isolando-os e identificando-os a nível macro e microscópico, além de molecular (genético), preliminarmente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Identificar fungos filamentosos que contaminam o processo de tratamento de soro do leite por microalgas em sistema aberto de forma a entender essa dinâmica.

### 2.2 Específicos

- Caracterizar a níveis macroscópicos as colônias fúngicas isoladas;
- Analisar microscopicamente as cepas fúngicas em termos de hifas vegetativas e reprodutivas;
- A partir das análises anteriores, induzir o possível gênero fúngico das cepas analisadas, servindo de base para a identificação molecular;
- Extrair e amplificar o material genético das cepas utilizar a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) com diferente *primers*.

### 3 INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS E SORO DO LEITE

#### 3.1 Indústria do leite

A indústria de laticínio possui grande importância social e econômica no Brasil visto que só no segundo semestre de 2022 a quantidade de leite cru adquirido foi de 5.397.811 mil litros e a quantidade de leite industrializado foi de 5.389.682 mil litros (IBGE, 2022). Além disso, apesar da perecibilidade do leite líquido fresco e dos produtos lácteos frescos, esse setor provou ser resiliente mesmo durante a pandemia de COVID-19 a qual comprometeu alguns setores devido a interrupções na cadeia de suprimentos (OCDE/FAO, 2021). No cenário internacional, o leite é comercializado principalmente na forma de produtos lácteos processados e sua produção mundial cresceu 1,4% em 2020. Na Índia, o maior produtor mundial de leite, a produção aumentou 2,1% neste mesmo ano (OCDE/FAO, 2021).

Apesar da sua importância, a indústria de laticínios caracteriza-se por consumir grande quantidade de água para operações de processamento e limpeza que somada as operações unitárias como filtração, separação, pasteurização, resfriamento e homogeneização, acarretam em resíduos sólidos e líquidos (AHMAD et al., 2019). A vazão dos efluentes líquidos varia também conforme as variações sazonais devidas às modificações introduzidas no perfil qualitativo e/ou, quantitativo da produção, nos horários de produção, nas operações de manutenção, entre outras. O efluente gerado contém elevado teor de nutrientes, poluentes orgânicos persistentes e agentes infectantes. Para cada litro de leite processado estima-se uma produção de 0,2 a 10L de água residual o que gera cerca de 4 a 11 milhões de toneladas de resíduos lácteos por ano (CHOKSHI et al., 2016).

Os resíduos lácteos, em geral, possuem sólidos em suspensão, matéria orgânica, alto teor de nitrogênio e fósforo e presença de óleos e graxas conforme a Tabela 1. Além disso, podem conter resíduos dos produtos de limpeza utilizados na higienização de utensílios e equipamentos. Em geral, a poluição causada pela indústria de laticínios pode afetar a qualidade do ar, do solo e da água, quando seus efluentes não tratados adequadamente (AHMAD et al., 2019). Dessa maneira, faz-se necessária a implementação de sistemas de tratamento de efluentes otimizados e integrados com a identificação dos pontos críticos de geração dos despejos líquidos no processamento para que se tenha uma produção sustentável (SARAIVA et al., 2002).

Tabela 1 – Características dos efluentes da indústria de laticínios

<b>Tipo de efluente</b>	<b>DQO (mg/L)</b>	<b>DBO (mg/L)</b>	<b>pH</b>
Fábrica de laticínios árabe	3.383 ± 1.345	1941 ± 2.700	7,9 ± 1,3
Efluente de laticínios	1.900-2.700	1200 - 1800	7,2 - 8,8
Águas residuais de laticínios	2.500-3.000	1.300 - 1.600	7,2 - 7,5
Soro do Leite prensado	80.000 – 90.000	120.000 – 135.000	6
Água de lavagem da indústria de laticínios Aavin	2.500 – 3.300		6,4 – 7,1

**DQO** – Demanda Química de Oxigênio; **DBO** – Demanda Bioquímica de Oxigênio.

Fonte: Adaptado de Shete e Shinkar (2013).

As águas residuais devem ser pré-tratadas para o aumento na eficiência da remediação antes de serem submetidas ao tratamento final. Inicialmente, o efluente é peneirado por meio de telas de arame para a remoção de partículas sólidas presentes. Em seguida, o pH do efluente é determinado e corrigido para que este possa ser direcionado para a estação de tratamento correta de acordo com sua alcalinidade (JOSHIBA, 2019).

O tratamento de efluentes torna-se essencial para eliminação dos seus compostos nocivos sendo necessárias operações mecânicas e biológicas no combate a compostos orgânicos e/ou inorgânicos, suspensos e/ou dissolvidos presentes nos efluentes (BEDOYA et al., 2016). Dentre as principais formas de tratamento de efluentes de laticínios de acordo com Carvalho (2013) destacam-se os processos biológicos, o tratamento físico-químico e os pantanais construídos.

Os métodos biológicos são propícios para o tratamento de efluentes com alto teor orgânico, podendo ser classificado em duas formas, aeróbio e anaeróbio, os quais para serem eficientes dependem de fatores como a capacidade dos microrganismos do sistema em degradar a carga orgânica e outras substâncias quimicamente tóxicas (AHMAD, 2019). Os despejos do manejo de laticínios respondem bem aos tratamentos biológicos devido aos materiais como gordura, lactose, proteína, serem facilmente degradados por microrganismos consumidores de oxigênio (XIAO et al., 2011).

Os tratamentos físico-químicos podem ser obtidos por oxidação ou pela coagulação/floculação. A oxidação acontece por meio da aplicação de ozônio no resíduo, que pode reagir tanto com os compostos orgânicos, quanto com a adição de metais, de forma a aumentar a eficiência do processo (ASSELIN et al., 2008). Já a coagulação/floculação se

apresenta como um sistema de maior simplicidade e economia pois consiste no processo de aplicação de reagentes que desestabilizam as partículas coloidais em suspensão. Essas posteriormente se unem formando partículas maiores denominadas de flocos que serão removidos em seguida (GUGLIELMOTTI et al., 2011).

O tratamento por pantanais construídos consiste em uma área controlada receptora de águas residuais. Contém um mecanismo de filtração, degradação microbiana da matéria orgânica por biofilmes aderidos e de absorção de nutrientes e poluentes pelas vegetações de macrófitas aquáticas presentes (MENDONÇA et al., 2015; MATOS et al., 2010). Esses sistemas vêm ganhando popularidade e estão sendo utilizados por grande número de indústrias de laticínios no exterior, pela eficácia da remoção de DBO das águas residuais e do baixo custo de implantação e monitoramento em comparação aos demais sistemas convencionais (MENDONÇA et al., 2015).

### **3.2 Produção e características do soro do leite**

O soro de leite é um coproduto da indústria de laticínios representado pela porção aquosa do leite que se separa do coágulo durante a fabricação de queijo ou da caseína. Apresenta-se como um líquido opaco e de cor amarelo-esverdeada (SARAVANAN et al., 2022). Nas indústrias de processamento de leite, More et al. (2010) citam que o mesmo pode ser obtido por três operações principais: (1) coagulação enzimática, resultando na coagulação das caseínas, matéria-prima para a produção de queijos, e no soro doce; (2) precipitação ácida no pH isoeletrico das caseínas ( $pI = 4,6$ ), resultando na caseína isoeletrica e no soro ácido; e (3) separação física das micelas de caseína por microfiltração, em membranas de  $0,1 \mu m$ , obtendo-se um concentrado de micelas e as proteínas do soro.

A cor amarelo-esverdeada se deve a presença de riboflavina, em torno de 65g de sólidos totais por litro, sendo a sua composição influenciada pela origem do leite, dos tipos de queijo fabricados e, geralmente, por fatores relacionados ao animal como raça, ciclos sazonais, alimentação e fase de lactação (AHMAD et al., 2019). De forma geral, o soro de leite contém lipídios, carboidratos, vitaminas solúveis, minerais e proteínas (LEÓN-LÓPEZ et al., 2022; PIRES et al., 2021).

Pode-se classificar o soro do leite como doce quando é gerado a partir da coagulação da caseína em pH de aproximadamente 6,5 e como ácido quando possui pH menor que 5 quando acontece um processo de fermentação (Tabela 2). Outra forma de obter soro ácido é no caso de

utilização de ácidos orgânicos ou minerais para promover a coagulação da caseína, como por exemplo, na produção de queijos frescos como ricota e o *cottage* (KASMI, 2016; GANNOUN et al., 2008). A utilização do soro do leite ácido é restrito devido ao sabor e alto teor de sal apesar de possuir maior concentração de cálcio se comparado ao doce. Por outro lado, o soro do leite doce possui maior teor de proteínas pois durante a coagulação ácida o pH do meio encontra-se próximo ao ponto isoelétrico da caseína acarretando a precipitação de mais proteínas do leite (PANESAR et al., 2007).

Tabela 2 - Componentes dos diferentes tipos de soro do leite

<b>Componentes</b>	<b>Soro do leite doce</b>	<b>Soro do leite ácido (g. L<sup>-1</sup>)</b>
Sólidos totais	63-70	63-70
Lactose	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Cálcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1-3	2-4,5
Lactato	2	6,4
Cloreto	1,1	1,1

Fonte: Adaptado de PANESAR et al. (2007)

No aspecto físico-químico, o soro do leite destaca-se por sua alta concentração de DQO (50-102 g.L<sup>-1</sup>) e DBO (27-60 g.L<sup>-1</sup>), geralmente, o que equivale a aproximadamente cem vezes a do esgoto doméstico (PANESAR et al., 2007). Além disso, também é composto por ácido cítrico e láctico (0,02 a 0,05%), por compostos de nitrogênio não proteicos, como ureia e o ácido úrico e vitaminas como, por exemplo, a do complexo B (RIVAS et al., 2013). Seus sólidos suspensos totais estão em torno de 1,3 a 22,0 g.L<sup>-1</sup> e a sua salinidade, que possui um valor elevado e uma condutividade de cerca de 8 mS.cm<sup>-1</sup>, é oriunda da adição de NaCl no processo de fabricação do queijo e do tipo de soro que é produzido (PRAZERES, 2013).

Para cada quilo de queijo, são necessários 10 L de leite, e deste processo produtivo são gerados 9 litros de soro de leite (MOREIRA et al., 2010). Tem elevado valor nutricional e pode ser processado e se transformar em produtos com alto valor agregado (TEIXEIRA; FONSECA, 2008). No entanto, estudos apontam que cerca de 40% do soro do leite produzido no Brasil é descartado de forma inadequada, principalmente pelas pequenas e médias empresas (MARQUARDT et al., 2012) transformando-se em um rejeito industrial nocivo à natureza

e causando alto impacto ambiental, pelos prejuízos à fauna e flora (MOREIRA et al., 2010; PAULA et al., 2011).

Por apresentar um alto valor nutricional, estudos apontam novas alternativas de aproveitamento do soro do leite através de uma série de variações desse subproduto afim de utilizá-lo como antioxidante e anti-hipertensivo (AHMAD et al., 2019). Além disso, pode ser utilizado como matéria prima na fabricação de fermento, lactose, ácido láctico, como também suplementos alimentares (KASMI, 2016). Nos países desenvolvidos, tais como Estados Unidos e Irlanda, a proporção da utilização do soro do leite para a geração de novos produtos chega a 100% do volume produzido (BIEGER; LIMA, 2008). No entanto, no Brasil, convive-se com a problemática de indicar caminhos para solucionar problemas ambientais relacionados ao seu descarte inadequado (FLORÊNCIO et al., 2013).

Os sistemas de tratamento de efluentes de laticínios que usam métodos biológicos clássicos removem compostos orgânicos, fósforo e nitrogênio do efluente a um custo relativamente baixo. Esses métodos são geralmente a escolha principal para os engenheiros ambientais. Tratamento aeróbico ou anaeróbico são utilizadas para lidar com efluentes lácteos de forma eficiente. No entanto, o lodo produzido durante a biodegradação aeróbica pode causar problemas de descarte significativos e caros (KRISHNA et al., 2022).

### **3.3 Processos de tratamento biológico do soro do leite**

As principais formas de tratamento são por intermédio de processos biológicos que podem ser realizados através da digestão anaeróbia e aeróbia. O que difere os dois conceitos de digestão é a utilização de microrganismos que necessitam ou não de oxigênio para sua respiração. A digestão anaeróbia acontece na ausência de oxigênio e é um método comumente utilizado para tratamento de águas residuais com elevada carga orgânica. Pode ser realizada com a utilização de reatores do tipo anaeróbico de manta de lodo (UASB) como também de tanque continuamente agitado (CSTR) que é capaz de receber grande quantidade de carga orgânica e apresenta alta taxa de decomposição (AHMAD et al., 2019).

O tratamento aeróbico acontece na presença de oxigênio onde o efluente é submetido a uma reação de oxidação que leva a deterioração de microrganismos nocivos presentes no efluente industrial (REILLY, 2019). Esse tratamento é comumente distinguido em processos de crescimento suspenso e de crescimento convencionalmente imobilizado. Muitos métodos de tratamento aeróbico, como lagoas aeradas, lagoa de oxidação e processo de lodo ativado (PLA)

são efetivamente usados para o tratamento de efluentes industriais orgânicos (KUSGWAHA, 2011).

O sistema aeróbico encontra certa dificuldade na aplicação para tratamento do soro do leite bruto devido à alta concentração de carga orgânica presente o que pode causar limitações na sedimentação do lodo como também na transferência de oxigênio. Nesse contexto, Cordi et al. (2007) realizaram uma avaliação da remediação do soro do leite em sua forma diluída e compararam com sua forma mais concentrada. Para isso utilizaram o sistema de lodo ativado em um reator contínuo com diferentes diluições e tempo de retenção. Os autores atingiram valores de até 95% de remoção de DQO em meio diluído enquanto o meio que possuía maior concentração manteve seus índices de DQO altos mesmo com um tempo de retenção maior. Dentre os processos aeróbios, pode-se destacar as lagoas aeradas, filtros de gotejamento, o lodo ativado, contadores biológicos rotativos.

As lagoas aeradas são uma das tecnologias mais utilizadas para tratamento de efluentes de laticínios e funcionam como estratégia de eliminação da carga orgânica e inorgânica (OLLER, 2011). A relação custo-benefício e sua atividade eficiente tornaram as lagoas aeróbicas uma técnica adequada para o tratamento de efluentes de laticínios em muitos países em desenvolvimento. Pesquisadores afirmam que as lagoas podem ser utilizadas de forma eficiente para diminuir a concentração de nutrientes e compostos orgânicos nos efluentes industriais (LIN, 2012).

Os microrganismos residentes nas lagoas aeradas são os principais responsáveis pela degradação dos substratos orgânicos e inorgânicos presentes nos efluentes. As bactérias são uma categoria de procariontes presentes nas lagoas e suportam fortemente a degradação da carga orgânica composta no efluente. Diversas variedades de bactérias estão envolvidas no funcionamento das lagoas aeradas e eles ajudam na conversão do composto orgânico e inorgânico em compostos simples degradáveis (MOREIRA, 2014). Em relação ao bom funcionamento das lagoas aeradas é necessária a compreensão dos diferentes parâmetros dos microrganismos, como tipo, estrutura, morfologia e taxa de absorção de nutrientes dos microrganismos. A temperatura é considerada um dos importantes critérios na execução de lagoas aeróbicas devido ao seu grande impacto no metabolismo dos microrganismos (DENG, 2015).

Outro método interessante são os filtros de gotejamento, mais recomendados para tratamento de alto impacto de águas residuais industriais. Nesse método o efluente é implementado nos biofilmes desenvolvidos na superfície do meio, permitindo que os

microrganismos residentes nos biofilmes consomem o composto orgânico nas águas residuais, levando à degradação de substâncias orgânicas presentes nos efluentes (JOSHIBA, 2019).

Este sistema é composto por um meio de suporte juntamente com microrganismos com disposição para circulação de ar e pulverizador para distribuição do efluente (TATOULIS, 2015). Devido ao avanço tecnológico diversos materiais são utilizados como meios para o crescimento dos microrganismos. Normalmente, os meios são organizados em tipos distintos, como caminhos de fluxo vertical, tubular e cruzado. O meio é embalado com maior área de superfície, alta fração de vazios e maior permeabilidade (JOSHIBA, 2019). a eficiência do filtro de gotejamento depende de parâmetros como pH, temperatura, volume de biomassa, taxa de crescimento de microrganismos, absorção e taxa de remoção de nutrientes.

O processo de lodo ativado (PLA) também se destaca como tratamento biológico de efluentes e é um método indicado para tratar as águas residuais com carga orgânica e inorgânica, utilizado no tratamento de águas residuais domésticas e de esgotos. É recomendado para a remoção de compostos de carbono, nitrogênio e amônia presentes nas águas residuais de laticínios (DENG, 2015) devido à sua capacidade de remover e tratar os nutrientes presentes. Os microrganismos presentes consomem as substâncias de resíduos orgânicos em suspensão nas águas residuais e as convertem em um lodo ativado que é posteriormente removido e reciclado (UMIEJEWSKA, 2017).

O lodo ativado pode ser utilizado em Reator em Lote Sequencial (RLS). Neste sistema, as águas residuais são adicionadas a um reator de batelada única, tratadas para remover componentes indesejáveis e, em seguida, descarregadas. As águas residuais de laticínios contendo alto teor de compostos orgânicos pode ser efetivamente tratadas em RLS de lodo granular aeróbico. O lodo granular é um parâmetro importante cuja retenção de biomassa é maior do que em outros processos, pois sedimenta mais rápido do que as partículas de lodo ativado. Os componentes particulados presentes nas águas residuais de laticínios são adsorvidos nos grânulos e são degradados no ciclo RLS (NANCHARAIH, 2018).

O entendimento sobre os grupos microbianos e sua relação com essas substâncias orgânicas e o tratamento biológico de efluentes é necessário para rastrear e pesquisar rapidamente exposições de processos e aprimorar os procedimentos orgânicos que ocorrem nas estações de tratamento de efluentes. Neste método, as águas residuais são passadas para um tanque fornecido com aeração e, posteriormente, o lodo ativado é removido das águas residuais usando um clarificador que fornece águas residuais clarificadas. Este sistema também é eficaz na degradação de substâncias como proteínas, lactose, gorduras e óleos usando os microrganismos (MITRA, 2016).

Mais um exemplo de tratamento biológico aeróbico é o sistema de contadores biológicos rotativos (CBR) que são utilizados na remoção de compostos de nitrogênio dos efluentes industriais, especificamente o efluente com maior DBO e DQO (TATOULIS, 2015). Trata-se de um reator de crescimento acoplado que inclui um conjunto de discos girando de forma circular. Os discos rotativos são imersos nos efluentes lácteos contendo matéria orgânica e a superfície do disco é coberta com a camada de biofilme contendo microrganismos. Os discos com a camada de biofilme são submersos nos efluentes e girados em série levando à degradação do conteúdo orgânico pelo microrganismo presente nos discos. Os microrganismos do biofilme consomem o composto orgânico e o nutriente levando ao aumento do volume de biomassa. A camada de biofilme lentamente se torna espessa e aumenta o volume, fazendo com que o lodo engrossado caia dos discos e seja segregado no digestor de lodo onde é convertido em água e gás (KAMATH et al., 2018).

A rotação cíclica dos CBR abre caminho para que o biofilme consuma todas as substâncias orgânicas presentes nas águas residuais através das quais os nutrientes e a matéria orgânica são difundidas na camada de biofilme (ANUPAMA, 2013). O CBR é uma técnica natural para deteriorar os compostos orgânicos, adquirindo-lhes o contato adequado do ar. Os CBR são altamente preferidos para diversos tratamentos de efluentes devido às suas características como maior superfície, menor consumo de energia, custo-benefício, facilidade de construção, menor impacto, menor manutenção e facilidade de operação. Muito avanço tecnológico foi feito na CBR e ela se torna um dos principais sistemas de tratamento aeróbio de águas residuais.

Dentre os processos anaeróbicos, destacam-se os reatores do tipo Manta de lodo anaeróbico de fluxo ascendente (UASB) e os Filtros anaeróbicos de fluxo ascendente (UAF), que também podem ser utilizados para tratamentos do soro do leite (RIVAS, 2012). Pesquisas feitas com UASB utilizados como forma de tratamento do soro do leite em sua forma diluída alcançam mais de 95% de remoção de DQO e, também, alta produção de metano em curto tempo de retenção. Apesar do resultado da remoção ser considerável, a DQO residual presente no efluente ainda não se encontra dentro dos parâmetros mínimos permitidos para descarte (GANNOUN et al., 2008).

## 4 MICROALGAS

As microalgas são um grupo diversificado de microrganismos que podem ser encontrados na água, no solo, no ar, em micro habitats da casca das árvores (WIKER E BHATNAGAR, 2020) e, em alguns casos, até em animais. Em comparação com outros microrganismos, as microalgas têm vantagens únicas pois são produtores primários, têm a capacidade de realizar fotossíntese, absorvem a luz solar (fótons) e assimilam dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera para a produção de biomassa enquanto a maioria das bactérias e fungos sem aparato fotossintético precisam se alimentar de matéria orgânica (SAJJADI et al., 2019).

### 4.1 Características biológicas

A concentração de cada elemento presente nas estruturas biológicas das microalgas depende do tipo de microalga avaliado. Biologicamente as microalgas são formadas por compostos como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos (VIEIRA et al., 2020). São encontradas em grupo ou de forma individual, podem estar presentes em água doce e salgada e apresentam reprodução assexuada (LI et al., 2019). Podem ser microrganismos procarióticos (como as cianobactérias) ou eucarióticos (microalgas propriamente ditas) contendo clorofila *a* encontrada como células ou pequenas colônias. Os gêneros mais comuns são *Monoraphidium*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* e *Clorella* (ZANG et al., 2021).

A família de algas Scenedesmaceae (Filo Chlorophyta, Reino Plantae) possui várias espécies que estão sendo avaliadas atualmente para a produção de biocombustíveis e suplementos alimentícios (MANDAL & MALLICK, 2009). *Tetradesmus obliquus* (*Scenedesmus obliquus*) é uma espécie com alto índice de crescimento, sendo uma das mais conhecidas mundialmente na produção de biodiesel, suplementos farmacêuticos, suplementos nutricionais e outros compostos de interesse industrial (DOS SANTOS et al., 2021). Essa espécie tem como características a coloração esverdeada, possuir uma alta capacidade de produção de triacilgliceróis e alta eficiente do ponto de vista fotossintético, mesmo em sob condições em que há limitação de nitrogênio (LEÓN-SAIKI et al, 2020). Nesse contexto, essa espécie tem sido alvo de pesquisas como alternativa de remediação de efluentes devido a sua capacidade de utilização de variadas fontes de carbono orgânico e inorgânico e sua fácil adaptação em frente a condições adversas (BENTAHAR, 2022).

Devido aos benefícios mencionados e suas inúmeras aplicações, as microalgas têm atraído a atenção de pesquisadores de várias áreas, como ciências ambientais, biologia,

genética, química, engenharia química, medicina, ciência de polímeros, agricultura e aquicultura. A pesquisa em microalgas é diversificada, desde a investigação genômica ao tratamento de efluentes, da extração farmacêutica à produção de bioenergia, da biomitigação de CO<sub>2</sub> à fabricação de biofertilizantes, entre outras. Sua pesquisa compreende principalmente processos *upstream*, *midstream* e *downstream*. O processamento *upstream* concentra-se no cultivo de microalgas e na maximização da produção de biomassa. O processamento *midstream* visa colher microalgas do meio de cultivo, secar a biomassa coletada e romper as paredes celulares das microalgas antes do processo de extração. O processamento *downstream* visa a extração e purificação do(s) bioproduto(s) da biomassa de microalgas (MANIRAFASHA et al., 2016).

Os principais elementos responsáveis pelo crescimento das microalgas são o carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) entre outros específicos de cada espécie. A forma de cultivo das microalgas é em sistema *outdoor* (aberto) como, por exemplo, lagoas e tanques de cultivo; mas pode, também ser em sistema *indoor* (fechado) que é o caso dos fotobiorreatores tubulares e de placas paralelas (FERNÁNDEZ, 2001). O estudo do seu cultivo é importante devido as vantagens econômicas e elevada taxa de crescimento oferecida na utilização das mesmas para remediação de efluentes. Além disso, a biomassa que é produzida ainda pode ser comercializada como matéria prima de produtos com alto valor agregado que é o caso dos biocombustíveis (YU et al., 2017).

#### **4.2 Cultivo de microalgas em sistema aberto e fechado**

Existem duas abordagens principais para o cultivo de microalgas em larga escala: cultivo aberto ou fechado. As principais diferenças entre os sistemas abertos e fechados estão relacionadas à forma como eles operam, vulnerabilidade a influências externas e custos de construção de operação (JERNEY; SPILLING, 2018). Ambos os sistemas possuem algumas vantagens e desvantagens.

Sistemas abertos são comumente utilizados para o cultivo de duas a seis espécies de microalgas com vários processos evolutivos, tendo como vantagem o crescimento rápido e tolerância a altos níveis de oxigênio dissolvido no meio. Porém, esses sistemas estão sujeitos a alterações devido a incidência de chuvas e evaporação, assim como a produção de agentes tóxicos pelas células durante o seu desenvolvimento. Além disso, uma vez que não há limpeza contínua da água, existe a possibilidade do acúmulo crescente de matéria orgânica devido à morte e decomposição das microalgas (Shen et al., 2009). O design dos sistemas abertos tem uma grande variedade de formas e tamanhos e compreendem as lagoas abertas simples, onde

não há mecanização para homogeneização do cultivo, diferente das lagoas com sistema de fluxo circulares, que apresentam um braço mecânico no centro.

Os tanques abertos devem apresentar pequena profundidade para garantir a iluminação uniforme do cultivo e maior produtividade em biomassa (BOROWITZKA, 1999). Por outro lado, esses sistemas apresentam perdas de CO<sub>2</sub> para a atmosfera e estão sujeitos à variação de temperatura e evaporação do meio de cultivo (BENEMANN et al., 1997). O modelo mais utilizado é o *open pond*, um tanque de fácil funcionamento com via de circulação contínua evitando que as células sedimentem no fundo e permitindo que recebam luz solar de maneira uniforme. Entretanto, esses tanques necessitam de alta demanda de energia elétrica para o seu funcionamento (VIEIRA, 2013). Uma pesquisa envolvendo as microalgas *Chlorella* sp., *Spirulina* sp. e *Dunaliella salina* revelou que essas espécies são cultiváveis em sistemas abertos devido a sua capacidade de se desenvolver em ambientes altamente seletivos. Este fato torna possível o cultivo livre do prejuízo da contaminação por outros microrganismos (COLLA et al., 2002).

Os sistemas fechados compreendem os fotobiorreatores que permitem a captação da luz pelas microalgas para a realização do processo de fotossíntese. Nesse sistema é possível evitar a contaminação por microrganismos invasores, não há perdas por evaporação, é possível realizar o controle de temperatura e pH, há menor impacto ambiental, e os designs técnicos são flexíveis (PULZ, 1992; MATA, 2010). A partir dos fotobiorreatores é possível controlar a maior parte dos parâmetros no cultivo de microalgas, possibilitando longos períodos de cultivos contínuos, resultando em alta produtividade celular (CHISTI, 2008). Como resultado, há maior produtividade de biomassa celular e redução do impacto ambiental causado pela eutrofização. Por outro lado, o cultivo em fotobiorreatores está sujeito a superaquecimento do meio de cultivo devido à proximidade da fonte de luz (quando artificial), além do acúmulo de material biológico e oxigênio (O<sub>2</sub>). Além disso, ainda possuem custos maiores de construção e operação elevados, que podem torná-los financeiramente inviáveis para produção de biomassa em escala industrial (MATA, 2010).

Os fotobiorreatores tubulares podem ser aparelhados horizontalmente, inclinados na vertical ou em espiral (RICHMOND, 2004). A instalação dos tubos deve maximizar a exposição à iluminação de modo que o diâmetro e o tamanho dos tubos são considerados fatores limitantes. Os tubos devem apresentar no máximo 10 cm de diâmetro para garantir o suprimento de luz (CHISTI, 2008) e o comprimento dos tubos deve evitar o acúmulo de oxigênio (O<sub>2</sub>), fator que limita a fotossíntese. Oxigênio em excesso pode ocasionar a redução

da produtividade de biomassa, resultando em variações de pH no meio de cultivo (ERIKSEN, 2008).

### **4.3 Tipo de biorreatores usados para o cultivo de microalgas**

No estudo de microalgas, a seleção de um recipiente apropriado para seu cultivo é um dos fatores importantes que precisam ser decididos no estágio inicial. Normalmente, o termo biorreator é aplicado aos recipientes que suportam o crescimento de microalgas para produção de biomassa e formação de produtos. A este respeito, fotobiorreatores referem-se a biorreatores que fornecem luz para microalgas fotoautotróficas que precisam de luz como fonte de energia. Biorreatores com diferentes tamanhos, formas e materiais estão disponíveis para o cultivo de microalgas.

Os biorreatores artesanais são feitos principalmente de vidraria transparente ou materiais poliméricos como o policarbonato, que podem ser montados pelos próprios pesquisadores ou fabricados e vendidos por empresas locais. Por exemplo, Choi et al. (2019) projetaram um fotobiorreator à base de filme de polímero para cultivo de microalgas, desenvolvendo um fotobiorreator de coluna de bolhas à base de polipropileno (10 cm de diâmetro e 120 cm de altura) para o cultivo de várias espécies de microalgas. Frascos, garrafas ou potes de Erlenmeyer com diferentes volumes têm sido amplamente utilizados como biorreatores sendo estes equipados com um tubo para aeração e mistura do meio e cobertos por uma tampa, rolha de algodão, papel alumínio ou parafilme para diminuir a evaporação e contaminação (ALAMI, 2021).

Embora esses biorreatores simples ajudem com sucesso no crescimento de microalgas e na produção de biomassa e possam atender aos requisitos de muitos tópicos de pesquisa, eles nem sempre são apropriados. Por exemplo, em alguns experimentos, o nível de pH, as concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, a temperatura etc. devem permanecer constantes. Neste caso, biorreatores avançados disponíveis comercialmente são necessários para controlar e monitorar parâmetros sensíveis e alcançar o desempenho ideal do sistema durante os experimentos. Esses biorreatores de alta tecnologia podem regular parâmetros como temperatura, pH, pressão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, transferência de massa e calor, fornecimento de nutrientes, tempo de retenção hidráulica, velocidade do fluido, tensão de cisalhamento e crescimento celular (MUSTAFA et al., 2018). Dependendo do modelo e da aplicação, os biorreatores avançados podem controlar vários dos parâmetros mencionados acima. Por exemplo, Li et al. (2003) usaram um fermentador de tanque agitado modelo BiofloIII, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, como biorreator para cultivo de microalgas. Eles equiparam o biorreator com um sensor de pH, medidor de pH, controlador

de fluxo de massa de CO<sub>2</sub>, controlador de fluxo de massa de ar, sensor de oxigênio dissolvido e medidor de oxigênio. Normalmente, esse tipo de fotobiorreator de alta tecnologia possui uma placa de aquisição de dados e um computador supervisor para monitoramento online dos parâmetros (NAIRA et al., 2019).

Os fotobiorreatores tubulares podem ser aparelhados horizontalmente, inclinados na vertical ou em espiral (RICHMOND, 2004). A instalação dos tubos deve maximizar a exposição à iluminação, de modo que o diâmetro e o tamanho dos tubos são considerados fatores limitantes. Os tubos devem apresentar no máximo 10 cm de diâmetro para garantir o suprimento de luz (CHISTI, 2008) e o comprimento dos tubos deve evitar o acúmulo de oxigênio (O<sub>2</sub>), fator que limita a fotossíntese. Oxigênio em excesso pode ocasionar a redução da produtividade de biomassa, resultando em variações de pH no meio de cultivo (ERIKSEN, 2008).

Os fotobiorreatores em placas são construídos por meio da junção de duas placas transparentes, as quais são posicionadas verticalmente ou inclinadas, oferecendo grande superfície de iluminação. Além da captação máxima de luz, esses fotobiorreatores não acumulam grandes quantidades de oxigênio dissolvido, levando à alta eficiência fotossintética (BRENNAN, 2010). Contudo, existem espécies de microalgas que aderem às paredes do fotobiorreator, impedindo a absorção da luz (KOCHEM, 2010).

Os fotobiorreatores em coluna possuem eficiência no processo de agitação, maior taxa de transferência de gases e maior controle das condições do meio de cultivo. São compostos por um sistema de bolhas para realizar agitação e a transferência de gases (ERIKSEN, 2008). Uma desvantagem do sistema de bolhas é o desenvolvimento de ambiente hidrodinâmico, que causa estresse mecânico nas células (SUZUKI-MATSUO et al., 1995). Podem apresentar várias colunas e a unidade geradora de bolhas é acoplada na parte inferior de cada coluna. A agitação pode criar um efeito de *flashing*, aumentando a eficiência da captação de luz e assim, contribuindo com a transferência de gases (AZEREDO, 2012).

As espécies de microalgas que não necessitam da luz para seu desenvolvimento são conhecidas como heterotróficas. Todavia, dependem de uma fonte de carbono orgânica adicionada ao meio de cultivo, como glicose, por exemplo. Portanto, as microalgas heterotróficas podem ser cultivadas em sistemas envolvendo biorreatores ou fermentadores com a inserção de substrato orgânico como fonte de carbono (ERIKSEN, 2008). Sistemas

heterotróficos possuem vantagens quando comparados com os fotoautotróficos, como a isenção da utilização de luz solar ou artificial. Além disso, a ampliação de escala é mais simples em relação ao tamanho do reator, ao sistema de agitação, de transferência de gases e de produtividade, já que não é obrigatório haver uma analogia entre superfície e volume (ERIKSEN, 2008). Li et al. (2007) indicaram que o sistema heterotrófico para produção de biomassa de microalgas apresenta grande potencial para a produção de biodiesel em grande escala. Estudos com a microalga *Chlorella protothecoides* cultivada heterotroficamente em laboratório (5L), planta piloto (750L) e em biorreatores comerciais (11000L) relataram alta taxa de produtividade e de conteúdo lipídico (50%) nas células, representando um aumento de 1,5 a 2 vezes quando comparado a sistemas autotróficos. Apesar da capacidade de utilizar a luz, as microalgas cultivadas nesse sistema apresentam baixa taxa de crescimento devido à pouca disponibilidade de luz quando cultivadas em larga escala ou quando atingem elevada densidade celular, e até mesmo quando ocorre fotoinibição causada pelo excesso de luz (RAGNI, 2008).

Cultivar microalgas em águas residuais pode ser considerada uma opção para reduzir os custos de produção e reduzir os impactos ambientais causados pela eutrofização. As microalgas utilizam compostos orgânicos e inorgânicos para seu crescimento, contribuindo para o tratamento de resíduos por meio da redução de nitrogênio e fósforo presentes em grandes concentrações nos efluentes (MIYAWAKI, 2014). O cultivo de microalgas em efluentes facilita o acesso a diversos meios de cultivo obtidos de matérias orgânicas e inorgânicas (ÓRPEZ et al., 2009; DICKNISON et al., 2013; TUANTED et al., 2014). Dessa forma, cultivar microalgas em efluentes (sistema mixotrófico) proporciona maior rendimento da biomassa produzida, uma vez que as células são capazes de assimilar as fontes orgânicas e inorgânicas de carbono disponíveis no meio (RADMANN et al., 2009). Uma técnica considerada altamente sustentável e que objetiva controlar a qualidade da água é a tecnologia de bioflocos. A biofloculação é realizada por meio da adição de carbono orgânico no sistema, o qual não sofre trocas de água ao longo do cultivo (AVNIMELECH, 2007; AZIM & LITTLE, 2008; CRAB et al., 2012). Esse tipo de sistema permite a reciclagem de nutrientes por meio da relação carbono/nitrogênio na água, estimulando a produção de biomassa microbiana e suplementação do cultivo (AVNIMELECH, 2007). O uso desse sistema é justificado pela reutilização de água, havendo pouca ou nenhuma renovação. Compostos nitrogenados são assimilados pela biomassa formada no próprio ambiente de cultivo, reduzindo o risco de contaminação (TACON et al., 2002; CRAB et al., 2009). A desvantagem desse tipo

de sistema é o acúmulo de nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo na água de cultivo devido à alta densidade de estocagem e pouca troca de água (KRUMMENAUER et al., 2011).

Um estudo utilizando efluente doméstico com cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* adaptada em cultivo com efluente reportou 90% de eficiência na remoção de matéria orgânica. O efluente resultante foi classificado como adequado para adubação do solo cultivado com *Zantedeschia aethiopica* (FONSECA et al., 2015). Outro aspecto importante na utilização de microalgas em sistemas de tratamento de efluentes é o aproveitamento da biomassa microalgal produzida, que pode ser utilizada para extrair lipídeos e posterior conversão em biocombustíveis de terceira geração (RODOLFI et al., 2009).

#### 4.4 Microalgas para tratamento de efluentes

Para fins de biorremediação, os tratamentos biológicos de efluentes com microalgas vêm sendo amplamente estudados há décadas, pois esses microrganismos representam uma alternativa eficaz para a remoção de contaminantes. As microalgas são microrganismos unicelulares ou multicelulares tipicamente encontrados em habitats aquáticos. Os nutrientes mais importantes para o crescimento das algas são dióxido de carbono, nitrogênio e fósforo, assim como Ca, Mg, Na e K para a fotossíntese (LAM et al., 2020; FERNÁNDEZ et al., 2018). Portanto, águas de fonte agrícolas e industriais, por exemplo, são boas fontes de nutrientes necessários para o cultivo de microalgas.

Oswald e Gotas (1957) propuseram o uso de algas para purificar esgoto na década de 1950, o qual lançou as bases para o uso de algas no tratamento de águas residuais. Em comparação com as estratégias tradicionais de tratamento biológico, o uso de microalgas tem vantagens como maior capacidade de consumo de nutrientes, pois são necessárias grandes quantidades de nitrogênio e fósforo para seu crescimento (LENG et al., 2018). Além disso, as microalgas oferecem a maior taxa de fixação de carbono atmosférico e são consideradas os fotoautotróficos mais promissores para fixação deste componente (SHAHID et al., 2020).

Xie et al. (2018) utilizaram a microalga *Chlorella vulgaris* e bactérias nativas para tratamento de efluentes de digestão anaeróbica com inicialmente 16,17 mg/L de nitrogênio total e 7,47 mg/L de fósforo total e obteve uma remoção de 100 e 99%, respectivamente. Assim como, Fito et al (2019), que utilizaram as microalgas *Chlorella sp.*, *Chlamydomonas sp.*, *Scenedesmus sp.* e uma bactéria nativa para tratar as águas residuais municipais com uma quantidade de fósforo total de 7,2 mg/L, conseguindo um percentual de remoção de 59,4%.

As microalgas podem realizar o processo de remediação do efluente por três vias principais: bioadsorção, bioabsorção e biodegradação. A bioadsorção de microalgas ocorre

quando os contaminantes são adsorvidos aos componentes da parede celular ou em substâncias orgânicas excretadas pelas células, enquanto a bioabsorção envolve o transporte ativo do contaminante para dentro da célula, onde se liga a proteínas intracelulares e outros compostos. No caso da biodegradação de contaminantes pela microalga, tem-se processos que envolve a transformação de composto complexos em moléculas de degradação mais simples através da degradação metabólica catalítica. A biodegradação fornece uma das tecnologias mais promissoras para a remediação de contaminantes preocupantes, pois pode transformar o contaminante em compostos menos tóxicos, em vez de atuar como um biofiltro (SUTHERLAND; RALPH, 2019).

O uso de microalgas para o tratamento biológico de efluentes, removendo nitrogênio, fósforo e carbono, de vários fluxos de águas residuais foi demonstrado com sucesso em várias escalas, sendo notória a capacidade deste microrganismo de possuir relações sinérgicas com outros tipos de microrganismos (AHMAD et al., 2019). Para manter o seu crescimento e a divisão celular estáveis, as microalgas precisam de uma fonte de energia. A depender das fontes de carbono e de energia utilizados, as microalgas são caracterizadas por fotoautotróficas, heterotróficas, mixotróficas e fotoheterotróficas (CHEN et al., 2018).

## 5 FUNGOS FILAMENTOSOS

O Reino Fungi é um dos grupos mais diversos da Terra. Os fungos vivem em diversos ambientes e sua dispersão na natureza ocorre por meio de agentes do ar e água, sementes, insetos, animais e seres humanos. A grande biodiversidade das espécies fúngicas reflete-se em suas características macroscópicas, em diferentes propriedades biológicas, em variados sistemas enzimáticos e em uma vasta produção metabólica. No Brasil são reconhecidas quase seis mil espécies de fungos, distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões (MAIA 2015).

### 5.1 Características biológicas

Os fungos filamentosos formam massas visíveis a olho nu chamadas de micélio, compostas de longos filamentos chamados de hifas que se ramificam e se entrelaçam (TAKAHASHI, 2017). Em linhas gerais, os fungos possuem parede celular composta por glucanas e quitina, são organismos eucariotos uni ou multinucleados, sendo homo ou heterocarióticos, haploides, dicarióticos ou diploides. A reprodução pode ser sexual (cariogamia e meiose), parassexual (cariogamia seguida de aneuploidia) e/ou assexual (divisão nuclear mitótica). São quimio-heterotróficos, obtendo nutrientes por meio da absorção de compostos orgânicos como fontes de carbono e energia. Como esses organismos conseguem sobreviver à custa de grande variedade de compostos orgânicos, podem habitar diversos ambientes como solo, água do mar, água doce e viver associados a animais, insetos, plantas e detritos orgânicos (HIBBET et al., 2007).

A classificação mais moderna dos fungos reconhece sete filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Os grupos Ascomycota e Basidiomycota têm um ancestral comum exclusivo e, por isso, são mais próximos filogeneticamente do que os outros grupos (ABRÃO et. Al., 2014). Alguns fungos apresentam características distintas quando se encontram no estágio assexuado (fungos anamórficos) e no estágio sexuado (teleomórficos). Por isso, nomes diferentes eram dados à mesma espécie, de acordo com o estágio em que se encontravam. Em 2011, o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (Código de Melbourne ou ICN), adotou no XVIII Congresso Botânico Internacional de Melbourne (Austrália) o fim da

nomenclatura dupla para as espécies de Ascomycetos e Basidiomycetos (SILVA-HUGHES, 2015).

A identificação dos fungos filamentosos é realizada principalmente por taxonomia clássica e por biologia molecular. No caso da taxonomia clássica, utilizam-se características morfológicas macroscópicas (superfície da colônia, aspecto da borda, diâmetro, cor dos conídios e micélio, textura, pigmentos solúveis, etc) e microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc.). Dentre os vários microscópios disponíveis para estudos morfológicos de fungos incluem microscopia óptica clássica, eletrônica, de fluorescência, de contraste de fase, confocal de varredura a laser e microscopia de força atômica. No entanto, a microscopia de luz composta é a forma mais comum de se usar para observação das características morfológicas (AHMAD 2012).

## 5.2 Fungos filamentosos no tratamento de efluentes

Os fungos são considerados os principais agentes degradantes de matéria orgânica no meio ambiente, e por essa razão, têm recebido destaque no que diz respeito a biorremediação (LÉON-SANTIESTEBAN 2019). Tem capacidade de diminuir substâncias nocivas dos poluentes por meio de absorção e liberação de enzimas catalíticas, afim de tornar os compostos presentes menos tóxicos para o meio. Além disso, apresentam resultados sinérgicos quando co-cultivados com outros grupos de microrganismos, como as microalgas (FERREIRA, 2020).

Nos processos de biorremediação os fungos de gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccaromyces* e *Trichoderma*, são utilizados nos processos de biorremediação devido a sua capacidade de desenvolver biomassas eficientes na remoção de poluentes em soluções aquosas (CHANDER, 2004). O gênero *Penicillium sp* é comumente utilizado devido a sua capacidade de degradar matéria orgânica a partir de mecanismos de desalquilação e desalogenação o que o torna propício para utilização em processos de biorremediação. Além disso, é comumente aproveitado no setor agrícola para controle biológico como também na área farmacêutica (MURPHY, 2015; YU et al., 2018).

Rani (2014) estudou a biorremediação de corantes têxteis utilizando os fungos *Aspergillus niger* e *Phanerochaete chrysosporium*, ambos isolados do solo contaminado por este efluente, tendo um apresentado uma descoloração de nigrosina de 90,15%, enquanto o outro obteve uma descontaminação de 77,47% sobre o mesmo composto respectivamente. Scherer e Barreto-Rodrigues (2022) avaliaram o potencial do tratamento biológico utilizando o

fungo *Pleurotus florido* combinado com ozonização catalítica, que resultou na remoção de 96,2% de lignina solúvel. Okoro (2008) utilizou o fungo *Penicillium sp.* para reduzir frações de hidrocarbonetos na água produzida (n-alcanos 608 mg/L, aromáticos 13,88 mg/L) alcançando uma remoção de n-alcanos de 89,3% e compostos aromáticos de 93%. Além disso, também estudou o fungo *Aspergillus niger* para o mesmo efluente que atingiu percentuais de remoção de 90,7% para n-alcanos e de 95,32% para os compostos aromáticos.

### 5.3 Simbiose entre microalgas e fungos filamentosos no tratamento de efluentes

Apesar das diversas qualidades das microalgas, ainda existem algumas dificuldades técnicas que as impedem de se industrializar. A colheita de células de microalgas é uma etapa economicamente desafiadora devido a sua pequena dimensão, motilidade, superfícies carregadas negativamente e baixas densidades celulares (GULTOM, 2013). Várias técnicas de colheita têm sido aplicadas, como, flotação, sedimentação por gravidade e centrifugação. Porém, o alto custo desses métodos limita sua aplicação (WANG et al., 2019). Dessa forma, para garantir a alta qualidade da produção de biomassa, a tendência atual é buscar materiais de origem biológica para uma colheita econômica e eficiente. Cultivar microrganismos ubíquos, como algas autofloculantes, fungos, bactérias e leveduras, para reunir cepas de algas através da biofloculação parece ser uma abordagem comparativamente ideal (ALAN, 2016).

Nesse contexto, estudos apontam que a associação de fungos filamentosos com microalgas foi desenvolvida para colher microalgas de forma eficaz, copeletizando-as em pellets de fungos. A floculação baseada em fungos filamentosos é considerada um método econômico e viável pois não são necessários agentes químicos adicionais e o tamanho dos pellets floculados são grandes (> 1 mm de diâmetro) e fáceis de colher (LENG, 2021) visto que formam morfologia esférica com alta estabilidade mecânica e melhor taxa de transferência de massa (CHEN et al., 2020). As propriedades únicas dos fungos e os abundantes recursos de enzimas degradantes contribuem significativamente para a remoção de poluentes nas águas residuais, como a biossorção de metais pesados (YADAV et. al., 2019) e a biodegradação de compostos farmacêuticos ou micro poluentes orgânicos (GOH, 2019).

Chen et. al, comparou sistematicamente métodos de colheita de microalgas assistidas por esporos de fungos (AEF) e microalgas assistidas por pellets de fungos (APF). A microalga utilizada foi a *Chlorella sp.* e o fungo *Penicillium sp.* Para tal análise, os parâmetros utilizados foram temperatura, concentração de glicose, pH e relação microalga-fungo. Dessa forma, concluíram que o método APF são afetadas pelos parâmetros pH e Glicose, enquanto a

temperatura e a glicose são essenciais para o método AEF. De forma geral, o método FPA mostrou ser mais promissor que o método AEF.

Adicionalmente, o sistema microalgal-fúngico tem uma excelente performance na remediação de efluentes devido a relação simbiótica existente entre as duas espécies, tornando a sua aplicação para remoção de nutrientes das águas residuais mais eficiente do que o cultivo tradicional. Enquanto os fungos são organismos heterotróficos que convertem matéria orgânica em dióxido de carbono através do metabolismo, as microalgas autotróficas utilizam as fontes de carbono inorgânico para acumularem biomassa (PÉREZ et al., 2020). Portanto, o oxigênio liberado da fotossíntese de microalgas fornece a respiração aos fungos, que em contrapartida retorna o dióxido de carbono às células das algas. Em geral, os efeitos finais do crescimento mútuo podem ser determinados pela razão de inoculação inicial de ambos, entretanto, se forem associados em proporções inadequadas, pode ocorrer crescimento unilateral de fungos ou algas, comprometendo a eficiência da remoção (YANG, 2018).

Alguns nutrientes, principalmente nitrogênio e carbono, são agregados em sólidos suspensos, o que dificulta a utilização direta das microalgas. Quando unidos ao modo de co-cultivo, essas matérias orgânicas macromoleculares transformam-se em nutrientes solúveis de baixo peso molecular com a ação de enzimas extracelulares fúngicas. Assim, as microalgas podem remover eficientemente mais nutrientes das águas residuais através da assimilação de matérias solúveis tratadas com enzimas (ZHAO, 2016). Em resumo, devido aos mecanismos de reforço mútuo entre microalgas e fungos, o sistema pode ser mais eficiente na remoção de nutrientes (por exemplo, nitrogênio, fósforo e DQO) do que um monocultivo.

O principal mecanismo para esta associação é a neutralização do pH pois a superfície da célula da alga possui carga líquida negativa devido à presença de grupos fosfórico, carboxílico, hidroxila, fosfodiéster e amina próton-ativos. As células fúngicas carregadas positivamente atuam como um flocculante catiônico para neutralizar a carga líquida negativa na superfície da célula de algas, adsorvendo assim as células de microalgas (WREDE et al., 2014). Além do conceito de neutralização de carga, vários outros mecanismos, como adesão de exopolissacarídeos, interação de proteínas de superfície, etc.

O pH parece ser o fator mais crítico para o processo de formação de pellets, quando está ligeiramente ácido é favorável à biofloculação (ZHOU, 2013). Além disso, o ambiente de crescimento ácido aumenta o crescimento de hifas, o que, em última análise, fornece mais locais de ligação para células de microalgas e promove a agregação de esporos fúngicos (Zhang e Zhang, 2016). No entanto, alguns estudos sugeriram que o pH alcalino é muito mais adequado para a formação de biopellets do que o ácido (PEI et al., 2021). Em essência, a eficiência de

floculação dependente do pH é altamente específica da espécie, uma vez que o valor do pH do ambiente de crescimento permanece estritamente sob o regime de vários resultados metabólicos de ambos os tipos de células. Portanto, é melhor escolher a cepa fúngica com uma ampla faixa de tolerância de pH, pois as microalgas podem tolerar. Além do pH ideal, vários outros fatores também são determinantes muito críticos da eficiência da floculação (LENG et al., 2021).

A adição de glicose no meio de crescimento torna o meio mais ácido, pois os fungos oxidam a glicose em ácido glucônico e ácido cetoglucônico, o que pode ser alcançado no mesmo nível com suplementos de ácido glucônico, quando adicionados ao meio de crescimento (Zhou et al., 2013). Um aumento igualmente significativo na eficiência da colheita foi relatado no sistema de cocultura com *Synechococcus subsalsus* e *Aspergillus niger* após suplementação orgânica (Oliveira et al., 2019). No entanto, isto não é economicamente viável, pois a adição de uma fonte extra de carbono também aumenta o custo experimental. Além disso, vários nutrientes inorgânicos, como o hidrogenofosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ) e o nitrato de amônio ( $NH_4NO_3$ ), também são fatores cruciais que influenciam a eficiência da floculação.

A intensidade da agitação é outro fator importante para a colheita eficiente e compactação do pellet. Os esporos de fungos não conseguem aglomerar-se sob baixa eficiência de agitação e, como resultado, dispersam-se rapidamente. A agitação fraca também não é recomendada para a colheita de microalgas devido à distribuição desigual de floculantes (Nasir et al., 2019). A morfologia do pellet parecia ser menor, mais suave e mais compacta sob alta taxa de agitação (Zhao et al., 2019). No entanto, não há uma explicação clara sobre a taxa de agitação ideal, que é responsável pela agitação ideal num ambiente de crescimento. Portanto, as diferenças nos resultados também podem ser atribuídas às demandas de diversidade de diferentes microrganismos por oxigênio (Ibrahim et al., 2015).

Song et. al, utilizou cepas de algas locais identificadas como *C. pyrenoidosa* para construção de um consórcio algas-fungos com *Penicillium sp.* para remediação de águas residuais de molho de soja e produção de biomassa. O consórcio mostrou ser mais eficaz na produção de biomassa se comparado a produção da alga ou do fungo sozinho. Além disso, a biomassa do consórcio com alto teor de proteína (65,3%) pode servir como matéria prima potencial para a produção da ração animal/peixe. O estudo mostrou que o consórcio tem uma boa relação custo-benefício e a produção sustentável de biomassa.

Logo, durante a aplicação de uma microalga para tratamento de um efluente em sistema aberto, sujeito a contaminação fúngica, é importante verificar quais fungos estão presentes no sistema, para avaliar a possibilidade de uma melhor associação simbiótica que favoreça o tratamento de efluente.

## 6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

Para a realização do isolamento de fungos é necessário colher amostras novas pois, se forem muito maduras ou prematuras, perdem as suas características iniciais (HYDE et al. 2010). Após essa fase, observa-se a disponibilidade, tamanho e morfologia das estruturas fúngicas utilizando-se da replicação que é um recurso importante para gerar maior precisão (em meio de cultura selecionado) (DUBOIS, 2010). Para um isolamento bem-sucedido das espécies-alvo é necessário que haja uma preparação e esterilização apropriadas dos meios e aparelhos para se evitar contaminantes (JAN et al., 2013; BASU et al. 2015; ATAIDES et al. 2018). A partir da amostra considerada, através da técnica da diluição seriada e espalhamento em meio de cultura, a forma mais básica para o isolamento de microrganismos como os fungos filamentosos.

Após o crescimento das colônias (culturas de microrganismos multiplicados). Além da avaliação das colônias crescidas sobre meios de cultura solidificados, verificando-se sua morfologia também é importante verificar suas características microscópicas, utilizando-se microscópio com lâminas preparadas com o microrganismo a ser visualizado.

Com o aprimoramento da tecnologia óptica, existem inúmeros microscópios com alto contraste e ampliação (AHMAD e KHAN, 2012). Além disso, diversas técnicas de ilustração e programas de software fornecem ferramentas extras para obter descrições detalhadas. Dentre os microscópios disponíveis para estudos morfológicos de fungo incluem microscopia óptica clássica, eletrônica, de fluorescência, de contraste de fase, confocal de varredura a laser e microscopia de força atômica. No entanto, a microscopia de luz composta é a forma mais comum de se usar para observar os caracteres morfológicos. Os microscópios devem ser mantidos limpos para obter imagens nítidas de contraste apropriado e evitar mau funcionamento.

As características morfológicas fornecidas pelas culturas são uteis para fins de identificação e compreensão biológica, principalmente do gênero de um microrganismo (GAMS, 2015), e o DNA extraído de suas células é usado para obter dados de sequência de genes para transcriptomas sob diferentes condições, sendo mais exatos para a identificação da espécie fúngica (ZENG et al., 2019).

## 6.1 Método da diluição seriada e técnica de espalhamento em meios de cultura

O primeiro passo para isolamento de microrganismos em qualquer inóculo é preparar uma série de diluições da amostra considerada que contenha o intervalo que se espera de células viáveis. A mais comumente usada é a razão de diluição de 1:10, por etapa de diluição, cuja metodologia denomina-se Método de diluição seriada decimal. Os inoculantes líquidos tem uma proporção de 1mL de inoculante para 9mL de diluente, gerando o mesmo fator de diluição (OLSEN et al., 1996).

O método de Diluição Seriada é definido por uma série de diluições sucessivas com o objetivo de converter uma solução densa em uma solução menos densa afim de viabilizar a a diluição dos microrganismos dentro de uma amostra, de forma a gerar colônias isoladas do mesmo microrganismo em meio de cultura. Essa técnica é muito usada em experimentos de microbiologia e bioquímica para diluir a concentração de microrganismos em uma amostra, como também para isolar culturas puras de microrganismos de populações mistas (CULLEN, 2016).

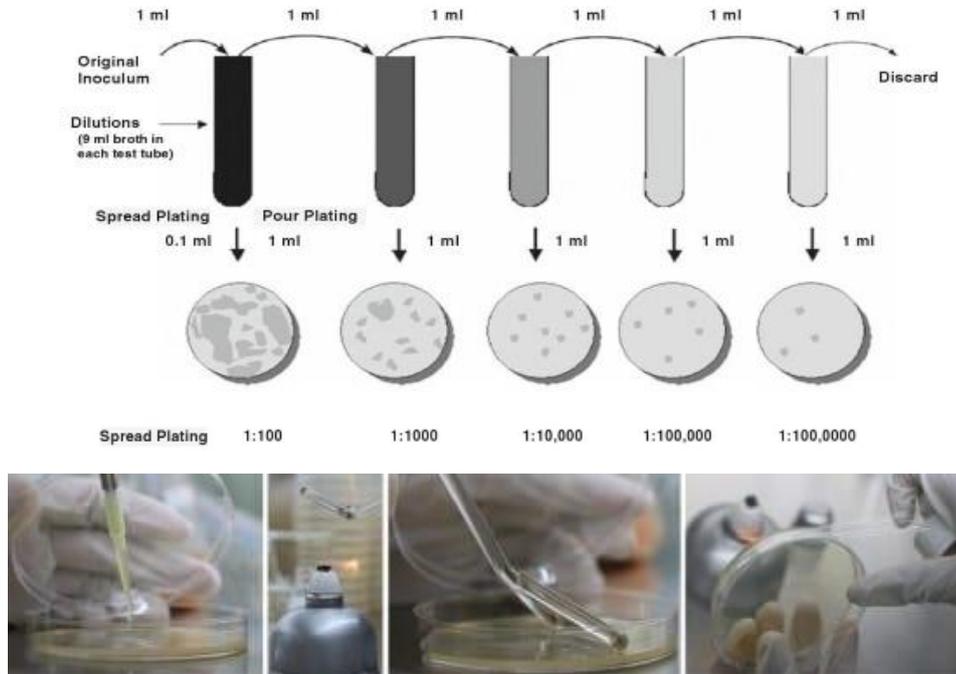
Como mencionado, na diluição seriada, a amostra selecionada é diluída através de um conjunto de volumes padrão de diluentes estéreis, como água destilada, soro fisiológico 0.9% ou água peptonada 0,1%. Depois disso, uma pequena quantidade de amostra de cada diluição é usada para preparar uma série de placas vazadas ou espalhadas (CARVALHO, 2018).

Um dos métodos para inoculação dos microrganismos em placa é denominado Método de Espalhamento em Superfície (*Spread Plate*). O método consiste em espalhar o material (suspensão de células) com o auxílio de uma Alça de Drigalski (para obtenção de colônias isoladas após diluição), fazendo a semeadura por toda a superfície da placa de Petri. Baseia-se na inoculação de um volume conhecido (geralmente 100µL) de uma diluição conhecida da amostra sobre a superfície do meio nutriente solidificado. Após incubação para crescimento, as colônias resultantes são contadas na diluição que apresente entre 30 e 300 colônias por placa. Relacionando-se o número de colônias, a diluição da amostra, e o volume inoculado, um número mínimo de células viáveis na amostra original pode ser calculado (DAMASCENO, 2011).

Nesse contexto, as técnicas de isolamento são numerosas e muitas vezes complicadas. Boas técnicas precisam isolar um número máximo de cepas de um espécime e obter o táxon desejado, excluindo todos os outros (HYDE et al., 2010). O método de diluição em série apresentado na Figura 1 combinada aos métodos de espalhamento em placas são uma ótima ferramenta de pesquisa visto que uma consiste na inoculação da amostra através da pressão da

alça de Drigalsky sobre toda superfície do meio ajuda a espalhar colônias isoladas sobre o meio (SCHIMIDELL et al., 2001; BEN-DAVID e DAVIDSON, 2014).

Figura 1 - Método da diluição com o espalhamento para isolamento dos fungos



Fonte: Kruger, Sharma e Varma (2009); Senanayake et al. (2020).

## 6.2 Caracterização macro e microscópica

O crescimento micelial pode ser diferenciado em morfologia macroscópica e microscópica (KRULL et al., 2010). Em cultivos em placas de Petri, com meio solidificado, a morfologia das colônias fúngicas são particulares para cada tipo de fungo, quando visualizadas os micélios crescidos (PAPAGIANNI, 2004). Por outro lado, a micromorfologia pode ser obtida com a ajuda de microscópios, que realizam a visualização das amostras fúngicas a níveis microscópicos sobre a organização das hifas, a forma e dimensão das hifas reprodutivas e suas estruturas, entre outras estruturas biológicas fúngicas (ZNIDARSIC; PAYKO, 2001).

Os fungos filamentosos podem ter seu gênero identificado a partir da junção das características macro e microscópicas e a comparação delas com os dados presentes em bancos na literatura.

As características morfológicas coloniais (macroscópicas) analisadas consistem na forma, que pode ser circular ou irregular, na pigmentação, cor versa (frente), reversa (atrás),

diferença entre a borda e o centro e a pigmentação do meio, no aspecto, que pode ser algodonoso, pulverulento, aveludado e coriáceo Figura 3, e a presença de elevações ou sulcos, tanto no lado verso quanto no reverso, como é possível ver na Figura 2 (DEMIP, 2023; EZEONUEGBU et al., 2022).

Figura 2 - Aspecto de diferentes colônias fúngicas sendo a) algodonoso, b) coriáceo, c) pulverulento e d) aveludado



Fonte: DEMIP (2023)

Figura 3 - Exemplos de características morfológicas das colônias

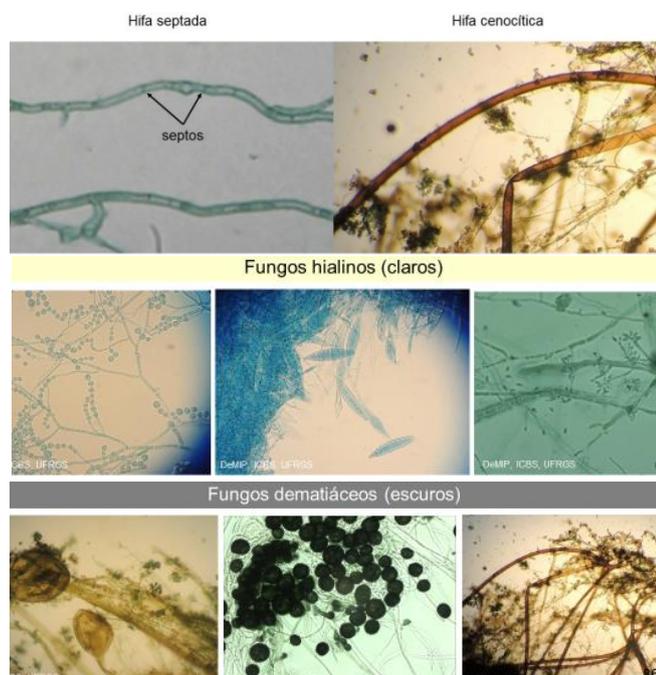


Fonte: (DEMIP, 2023)

Em se tratando das características microscópicas (morfologia celular), os principais pontos analisados são a forma das hifas, que podem ser cenocíticas ou septadas, a cor da hifa, a qual pode ser hialina ou escura, o tipo de estrutura reprodutiva e o tamanho e forma dos esporos. A estrutura reprodutiva dos fungos filamentosos, podem ser sexuadas ou assexuadas, com a presença de esporângios ou conidióforos, sendo os conídios caracterizados pelo seu arranjo (único, duplo ou cadeia), sua forma (circular, ovoide, encurvado, clava, espiralado e estrela), tamanho (macro e/ou microconídios), septos (septados transversais, septados

transversais e longitudinais ou não septados), pigmentação (hialino e dematiáceos) e superfície (lisa ou rugosa) Figura 4 (DEMIP, 2023; EZEONUEGBU et al., 2022).

Figura 4 - Características Microscópicas de diferentes fungos



Fonte: DEMIP (2023)

### 6.3 Caracterização molecular (genética)

O método para extração de DNA mais utilizado com sucesso para diferentes espécies é baseado no uso do detergente Brometo de Cetil-TrimetilAmônio (CTAB) (DOYLE e DOYLE, 1987). Esse detergente solubiliza as membranas celulares, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING et al., 1995). Porém, grande parte dos protocolos descritos na literatura apresentam modificações no protocolo CTAB padrão, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo resultantes principalmente do isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários (ROMANO & BRASILEIRO 1999), sendo acrescentados reagentes como Dodecil sulfato de sódio (SDS), Polivinilpirrolidona (PVP), Proteinase K e RNase, a fim de evitar possíveis contaminações.

A taxonomia dos fungos desses organismos ainda é desafiadora devido à falta de técnicas confiáveis e avançadas para sua identificação e estudos sistemáticos. Estudos anteriores sobre a composição de fungos em águas residuais dependiam do método tradicional de identificação baseado no crescimento, morfologia, metabolismo e atividade enzimática, ou

do uso de um gene marcador molecular para identificar os fungos em níveis de espécie (HELAL, 2011). No entanto, o uso de múltiplos genes marcadores para identificação de comunidades fúngicas em águas residuais não foi extensivamente estudado. A fim de resolver as dificuldades de identificação de fungos em nível de espécie, vários marcadores genéticos para classificação rápida de fungos com sequências conservadas incluem regiões espaçadoras transcritas internas (ITS), genes de beta-tubulina (Ben A), calmodulina (CaM) e polimerase de RNA II (RPB2) (RAJA, 2017).

As regiões espaçadoras transcritas internas (ITS) são usadas como código de barras universal oficial do DNA para fungos. Os ITS1, ITS2 e ITS4 provaram ser úteis para a identificação de leveduras e alguns fungos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Cryptococcus*, *Candida* e espécies de *Trichosporon* entre muitos outros (YIN, 2017). No entanto, as sequências ITS não podem ser usadas para análises filogenéticas de táxons não relacionados devido à baixa variabilidade e evolução lenta. Além disso, as sequências ITS nem sempre permitem a correta diferenciação das espécies, especialmente entre os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (HOUBRAKEN, 2011). Portanto, marcadores de genes adicionais são essenciais para a delimitação correta das espécies. marcadores moleculares secundários como beta tubulina; a calmodulina e a RPB2 têm sido utilizadas com sucesso na genômica fúngica (VISAGIE, 2014). Relatórios mostraram que esses genes que codificam proteínas continham regiões de íntrons altamente variáveis que contêm íntrons altamente variáveis que evoluem em uma taxa mais rápida em comparação com ITS (ASAN, 2019).

Os eucariotos que codificam proteínas polipeptídicas possuem os genes beta-tubulina os quais têm sido usados para análise filogenética em fungos. Quatro desses genes são encontrados em todo o reino fungi; dois genes de  $\alpha$ -tubulina (tub A) e dois de  $\beta$ -tubulina (tub B). Dois polipeptídeos alfa tubulina (alfa 1 e alfa 2) são produzidos pelo Tub A o alfa é produzido pelo Tub B. Pesquisas apontam que nas sequências dos genes da beta-tubulina é possível identificar mais informações sobre as relações evolutivas de diferentes espécies do que o gene rRNA da pequena subunidade (SSU), portanto, alega-se que é um ótimo sinalizador para estudo de análises aprofundadas de informações filogenéticas e para grupos de espécies complexas (RAJA, 2017).

A identificação por biologia molecular é uma forma mais moderna que consiste das seguintes etapas: i) extração do DNA, a partir do rompimento da parede celular e de membranas; remoção de impurezas e obtenção do DNA nuclear; ii) utilização da técnica de reação em cadeia polimerase (RCP), para amplificação da sequência de DNA. As sequências

da região ITS são as mais utilizadas para a identificação dos fungos, sendo consideradas o segmento universal para este grupo; iii) visualização do segmento de DNA que foi amplificado usando eletroforese; iv) purificação do segmento de DNA, para eliminação dos reagentes utilizados na RCP; v) sequenciamento, que identifica a ordem dos nucleotídeos adenina, citosina, guanina e timina em um fragmento de DNA; vi) análises em programas computacionais, para encontrar similaridades entre as sequências dos organismos alvos com sequências depositadas em um banco de dados (MANOHARACHARY, 2010).

## 7 METODOLOGIA

### 7.1 Microalga utilizada e sistema de tratamento

O soro do leite foi coletado no Instituto Federal de Alagoas – Campus Satuba (9°34'29.08"S 35°49'15.25"O), sendo um subproduto da produção de queijo coalho. Em seguida, houve a passagem do soro por centrifugação a 3000 rpm por 15 min e filtração em papel de filtro qualitativo, visando a remoção de sólidos grosseiros. Em seguida, o efluente foi congelado até o momento de sua utilização (-12 a -18°C). A microalga utilizada foi a espécie *Tetrademus obliquus* LCE-01 em meio solidificado de ágar nutriente (Kasvi). A concentração de inóculo nos tanques foi de aproximadamente 50 mg/L de peso seco celular, feitas com alça de níquel e cromo.

Os biorreatores foram vasos de acrílico transparente (PoliControl®) com dimensões de 18,7 x 12 x 12 sempre em centímetros. O volume inicial utilizado em cada experimento foi 1,5 L, utilizando-se cargas orgânicas, DQO (Demanda Química de Oxigênio) do efluente entre 1000-4000 mg/L, os ensaios foram agitados magneticamente (SP LABOR®), e realizados a temperatura de aproximadamente 30-35 °C. Foi utilizada uma intensidade de luz (medida com um radiômetro Delta Ohm 2302.0) de 100  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em uma das superf\u00edcies do reator durante 15 dias de tratamento e corrigindo-se o pH do tratamento para valores entre 7,5-8,0 diariamente.

### 7.2 Isolamento dos fungos filamentosos

O isolamento dos fungos foi realizado em trabalhos anteriores do grupo. Utilizou-se a t\u00e9cnica de dilui\u00e7\u00e3o seriada em capela de fluxo laminar para plaqueamento por espalhamento (al\u00e7a de Drigalsky), no meio BDA (Batata Dextrose Agar): (\u00e1gua de infus\u00e3o de 250 g de batata inglesa, 20g/L de dextrose e 15 g/L de agar) a pH 5,6.

Ap\u00f3s alcan\u00e7ar-se uma concentra\u00e7\u00e3o de UFC (unidade formadora de col\u00f4nia)/mL elevada e alcan\u00e7ando-se uma fase estacion\u00e1ria durante o tratamento (em torno de um log UFC/mL entre 9-10), al\u00edquotas do sistema foram tomadas, dilu\u00eddas seriadamente  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$ . Ap\u00f3s o crescimento das col\u00f4nias, em concentra\u00e7\u00e3o adequada e isoladas nas dilu\u00ed\u00e7\u00f5es apropriadas, essas foram coletadas e transferidas para placas de Petri contendo o meio BDA utilizando-se uma al\u00e7a de n\u00edquel-cromo por estriamento.

Após isso, as cepas foram replicadas algumas vezes, com a finalidade de se verificar a estabilidade delas para cultivo artificial em laboratório. Foram inicialmente isoladas 9 cepas fúngicas, das quais apenas 5 conseguiram ser replicadas com eficiência durante várias gerações e seguiram para as etapas de caracterização macroscópica e microscópica, além da identificação genética.

### **7.3 Caracterização macro e microscópica**

Na caracterização macroscópica das colônias avaliou-se aspectos como coloração da fase vegetativa e esporulada do fungo, diâmetro das colônias, elevação, margem, superfície e opacidade. Enquanto na visualização microscópica das colônias avaliou-se em microscópio óptico, com aumento de 10 e 40x, as tipologias das hifas (septadas ou cenocíticas) e das estruturas reprodutivas visualizando-se, por exemplo, o conidióforo, conídios entre outras estruturas (SENANAYAKE et al., 2020; MICROBIOLOGY SOCIETY, 2022; EZEONUEGBU et al., 2022).

Para visualização ao microscópio, lâminas foram preparadas cortando-se parte do micélio fúngico crescido nas placas de BDA, corando com o lactofenol azul de algodão e recobrimo-a com lamínula. A composição do lactofenol azul de algodão utilizado para coloração foi: 250 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico, 500 g/L de glicerina, 250 g/L de fenol, 1g/L de azul de anilina ou azul de metila e 250 mL de água destilada ou deionizada.

### **7.4 Caracterização molecular preliminar das cepas fúngicas**

#### **7.4.1 Extração de DNA**

Para caracterização molecular, foi realizada a extração e amplificação do DNA, a partir da massa micelial obtida de cada isolado a qual foi crescido em meio BDA por 10 dias e colocado 100 a 200 mg de tecido fresco em Eppendorf contendo tampão tris-HCL. O protocolo de extração utilizado é o CTAB adaptado de Doyle; Doyle (1987).

#### 7.4.2 Amplificação e sequenciamento do DNA

A amplificação de fragmentos do DNA realiza-se por Reação da Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados os primers que codificam para as regiões genômicas ITS,  $\beta$  tub, T1-T2 1 e 2a e 2b (Tabela 3). Em seguida, os produtos de PCRs foram enviados para sequenciamento diretamente na empresa ACTGene.

Tabela 3 – Descrição dos primers usados para identificação de espécies pertencentes aos fungos filamentosos

Gene	Primer	Sequências (5' -3')	Referências
ITS	ITS1	TCCGTAGGTCAACCTGCGG	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
$\beta$ -tub	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	O'Donnell; Cigelnik, 1997
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
$\beta$ -tub	BtT1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	
	BtT2	TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG	

As reações de PCR serão realizadas em um volume total de 30  $\mu$ l total, de acordo com a descrição na Tabela 4. O volume final das reações será ajustado para 30 $\mu$ L com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR serão realizadas em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cy32444cler) nas seguintes condições: (i) um ciclo a 94°C por 2 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 55°C por 30s (anelamento), e 72°C por 35 s (extensão); e um ciclo final à 72°C por 10 min (WHITE et al., 1990); (ii) 95°C por 8 min; 35 ciclos a 95°C por 15 s, 55°C por 20s, 72°C por 60 s, um ciclo final à 72°C por 5 min (CASTLEBURY et al. 2004). Após a amplificação, as amostras serão submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio e observados sob luz UV.

Tabela 4 – Descrição das concentrações para o PCR

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Concentrações (vol.)
DNA genômica	1.0 µl
d-NTP's	2.4 µl
Primers	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub>	0.9 µl
Tampão 10x	3.0 µl
Taq DNA polimerase	0.2 µl
H <sub>2</sub> O	18.5 µl

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa seção serão mostrados os resultados obtidos da identificação macroscópica das colônias, microscópicas das hifas, e molecular por PCR das 5 cepas fúngicas isoladas e replicadas a partir do sistema aberto de tratamento do soro do leite pela microalga *Tetradasmus obliquus*.

### 8.1 Características macro e microscópicas das espécies fúngicas

O objetivo principal foi tentar delimitar pelo menos o gênero das espécies fúngicas, pois consegue-se um indicativo de quais primers utilizar para a identificação molecular da espécie, etapa posterior do trabalho, e mais conclusiva na classificação taxonômica dos fungos.

#### 8.1.1 Identificação do fungo F2

As características macroscópicas das colônias do fungo F2 apresentaram cor verde-oliva, superfície algodonosa, margem branca e circular com uma cor reversa preta. Além disso, a superfície reversa do fungo apresentou uma estrutura com centro enrugado, semelhante a uma cratera (Figura 5). Em relação às características microscópicas, estas apresentaram hifas finas, septadas e ramificadas, assim como conídios em formato elipsoide e irregular. Essas observações indicaram semelhança do fungo com o gênero *Cladosporium*.

Figura 5 – Características macro e microscópicas do micélio do fungo F2.



Fonte: Autora (2023).

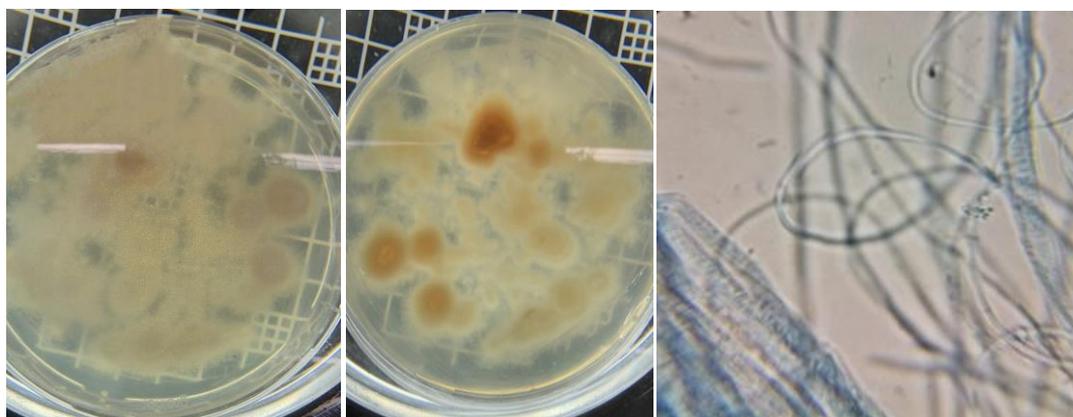
O gênero *Cladosporium* é pertencente ao filo *Ascomycota*, são fungos consumidores de matéria orgânica (BARNETT & HUNTER, 1998; TORRES et al., 2017). Yew, Chan, Ngeow, et al. (2016) ao estudarem sobre a adaptação de diferentes nichos ambientais e alergenicidade do genoma de *C. sphaerospermum*, observaram que a superfície reversa de suas colônias fúngicas possuem uma estrutura com centro enrugado, semelhante a visualizada nesse trabalho.

O gênero é de interesse de várias áreas por serem agentes de deterioração (BENSCH et al., 2012). Foi isolado de diversas plantas de tratamento de efluentes, como por exemplo, lodo ativado (AWAD e KRAMER 2011a; LIU et al., 2017; BURATTI et al., 2022). Dentre algumas aplicações mais específicas estão a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por espécies isoladas de *Cladosporium* (MARWAH BAKRI, 2022), biodegradação de polietileno por *C. haloterans* (NAPOTI et al., 2022), degradação de fungicida por *C. herbarum* (PAPAZLATANI et al., 2022) e tratamento de efluente de laticínios por *Cladosporium* sp. em co-cultivo com os fungos *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp e tratamento de efluente oleoso (QUEISSADA et al., 2013).

#### 8.1.2 Identificação do fungo F4

As características macroscópicas das colônias do fungo F4 (Figura 6) foram de cor inicialmente branca, amarelando-se com o tempo, superfície granular, borda branca e circular, com cor reversa amarela. Em relação às características microscópicas, observou-se hifas hialinas, finas, não septadas e espiraladas, com mudança de coloração com o tempo de cultivo, principalmente após 2 semanas de incubação.

Figura 6 - Características macro e microscópicas do fungo F4.



Fonte: Autora (2023).

Desse modo, a partir dos resultados obtidos e de acordo com Barnett & Hunter (1998) é possível que o fungo F4 pertença ao gênero *Epidermophyton*. Este fungo pertence ao filo *Ascomycota* caracterizado pelo seu crescimento lento, de 14-21 dias (SUMMERBELL, 2011). É utilizado para ensaios antimicrobianos (GEWEELY, 2006; TRIPATHI et al., 2010; EL-BONDKLY, 2012), não tendo sido muito encontrado em trabalhos de isolamento de fungos em sistemas de tratamentos de efluentes. Um raro trabalho sobre o gênero fúngico mostrou sua utilização par tratamento de efluente têxtil (PAPADIA et al., 2011).

### 8.1.3 Identificação do fungo F5

Em relação ao fungo F5 é possível reparar que esse microrganismo apresenta colônias de coloração branca e à medida que esporulam se tornam roseadas, superfície algodonosa, com borda branca irregular e cor reversa branca que ganha um tom amarelo com o passar do tempo (Figura 7). Para suas características microscópicas o fungo demonstrou hifas espiraladas, hialinas e finas e os conídios que foram possíveis de visualizar apresentaram formato arredondado (ovalares ou arredondados).

Figura 7 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F5.



Fonte: Autora (2023).

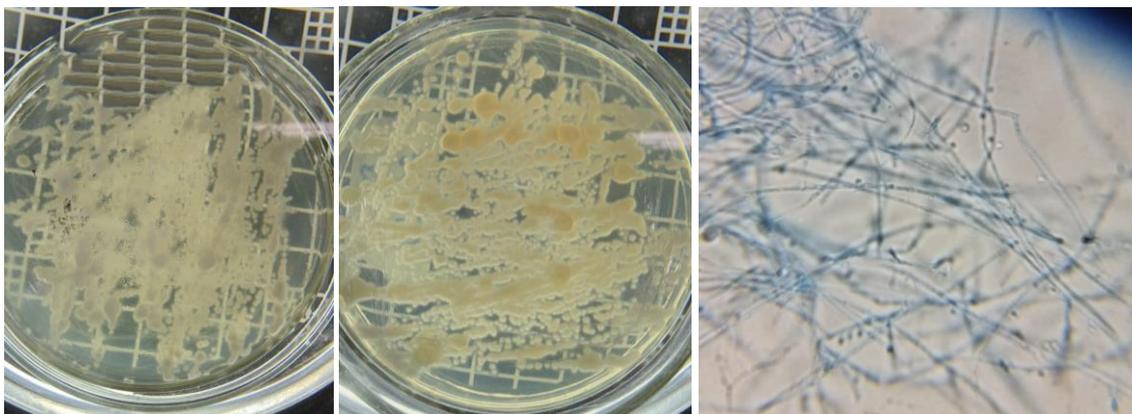
Pelas características observadas, acredita-se que o fungo seja do gênero *Trichophyton* do filo *Ascomycota* (BARNETT e HUNTER, 1998), pois Nwokeoma et al. (2017) ao estudar o crescimento de *Trichophyton gallinea*, *T. megninii*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* observou características macro e microscópicas semelhantes. De modo geral, esse gênero de fungo utiliza substratos queratinosos (BARNETT e HUNTER, 1998; KUMAR; SINGH; KUSHWAHA, 2021). Tem sido bastante encontrado em trabalhos de verificação da comunidade fúngica em

lodos de sistemas de tratamento de águas residuárias municipais ou em escala piloto (ULFIG e KORC, 1983; MORE et al., 2010; AWAD e KRAUMER, 2011b; LIU et al., 2017). Algumas aplicações são a biodegradação e biossorção de efluentes têxteis (YESILADALI et al., 2006) e remediação de fenóis (JUNG; HYUNG; PARK, 2003).

#### 8.1.4 Identificação do fungo F6

Macroscopicamente, o micélio fúngico F6 apresentou cor branca, superfície algodonosa, borda branca e circular e um coloração reversa em tom amarelado. Em relação as características microscópicas, foram visualizadas hifas não septadas, ramificadas e hialinas como também conídios globosos e intercalares (Figura 8).

Figura 8 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F6.



Fonte: Autora (2023).

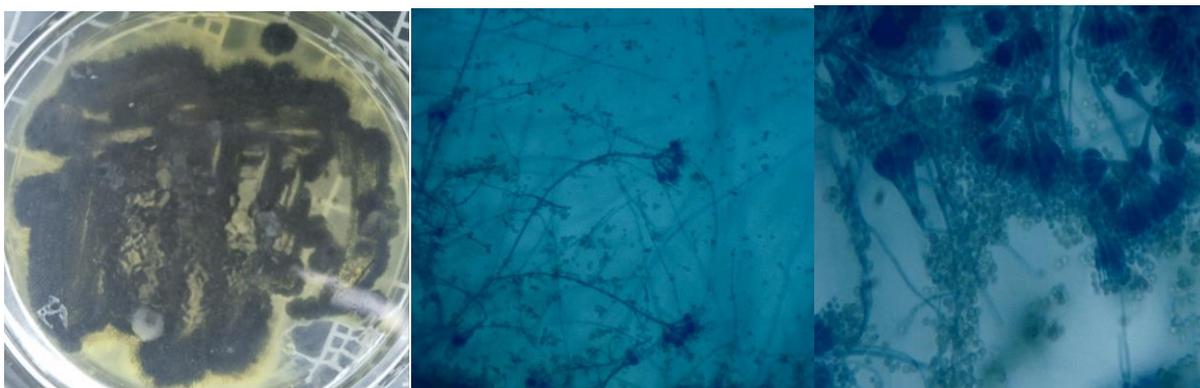
A partir dos resultados obtidos, se visualizou-se semelhanças com o gênero *Chrysosporium* como Correa et al. (2019) ao identificar *C. multifidum*. O gênero *Chrysosporium* é do filo *Ascomycota* com crescimento moderadamente rápido (BARNETT E HUNTER, 1998). Não se encontrou muitos estudos na aplicação desse gênero isoladamente, mas assim como os gêneros *Cladosporium* e *Thricophyton*, tem sido bastante encontrado em lodos de sistemas de tratamento de efluentes municipais ou em escala piloto (KAEPRZAK, WARCHROL e WIDOWSKA, 2003; MORE et al., 2010; AWAD e KRAUMER, 2011b; LIU et al., 2017). Em um raro trabalho, Kushwaha (1980) estudaram espécies de *Chrysosporium* e

verificou potencial biotecnológico para biorremediação e solo, secreção de enzimas e atividade antimicrobiana.

#### 8.1.5 Identificação do fungo F10

Inicialmente o fungo apresentou colônias macroscopicamente de cor marrom no centro e, à medida que se aproximava das extremidades, bordas circulares brancas (Figura 9). Uma coloração verde cinzenta era notada quando a colônia era mais envelhecida. O aspecto da superfície era granular e a coloração reversa da colônia, preta. Além disso, é possível visualizar a presença de hifas septadas e hialinas, ramificadas próximo ao ápice, terminando em grupo de fiálides. Em relação as hifas reprodutivas, haviam conídios globosos e conidióforo emanecendo de forma isolada (Figura 9).

Figura 9 - Aspectos macro e microscópica do micélio do fungo F10



Fonte: Autora (2023).

A partir desses resultados, sugere-se o fungo F10 como pertencente ao gênero *Penicillium*. Os fungos deste gênero, pertencente ao filo *Ascomycota*, comportam inúmeras espécies e apresentam um crescimento rápido, apesar de ainda ser motivo de discussão (BEZERRA, *et al.*, 2020). Este gênero é um dos mais abundantes no solo, além de crescerem em alimentos como queijo, pão, cereais e frutas. É um grande produtor de metabólitos de interesse biotecnológico, sendo um dos gêneros de fungos filamentosos mais aplicados em fermentação, ao lado do gênero *Aspergillus* (ASHTEKAR *et al.*, 2021).

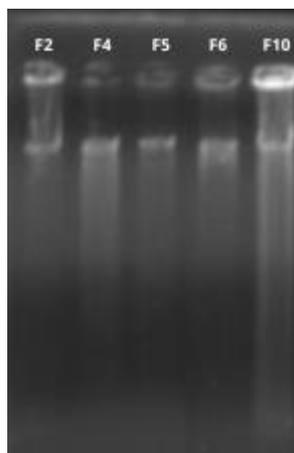
A aplicação desse gênero tem particular importância em processos de tratamento de resíduos e efluentes, sendo encontrados em quase todos os estudos referentes a isolamento de

comunidades microbianas em sistemas de tratamento de esgoto doméstico ou industriais (MORE et al., 2010; AWAD e KRAMER, 2011a, b; LIU et al., 2017; ASSRESS et al., 2019; ZHANG et al., 2020). É também muito usado na biorremediação de hidrocarbonetos (LEITÃO, 2009; COELHO et al., 2020; VEIGNIE e RAFIN, 2022). Wolski (2023) fez uma revisão sobre a aplicabilidade desse gênero em tratar efluentes industriais e agroindustriais, como corantes azóicos, hidrocarbonetos, efluentes da indústria de alimentos, compostos farmacêuticos, entre outros.

## 8.2 Caracterização molecular preliminar

Para a realização do sequenciamento para caracterização genética é necessária uma boa qualidade na etapa de extração do DNA genômico do isolado. A análise dessa extração por eletroforese em gel (Figura 10) nos mostra que esse processo ocorreu de maneira eficiente e nos dá uma percepção da concentração de DNA presente das amostras, fato muito importante para as etapas de PCR.

Figura 10 - Eletroforese em gel do DNA extraído dos fungos isolados.

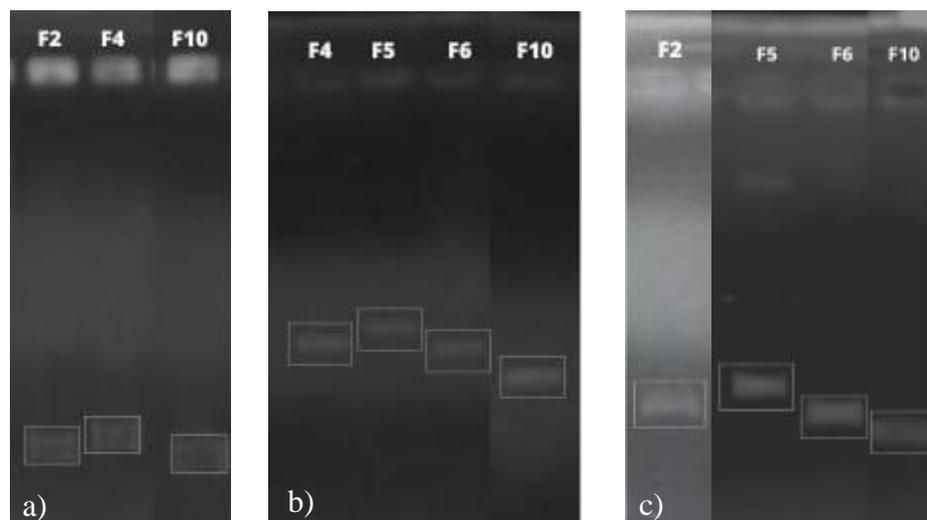


Fonte: Autora (2023).

A etapa seguinte consiste em realizar uma série de reações em cadeia da polimerase, que tem por intuito promover a replicação de um segmento do DNA por tantas vezes que seja necessária para concentra-lo e, assim, utilizá-lo em outros processos, como é o caso do sequenciamento.

O segmento do DNA a ser clonado é delimitado pelo primer utilizado e em razão disso, são utilizados diferentes pares de primers para que se tenham amostras com diferentes regiões do DNA, o que torna o processo de sequenciamento mais assertivo. Dos 5 isolados estudados apenas 3 amplificaram para região ITS, enquanto todos eles foram positivos para o gene beta-tubulina (Figura 11). Pesquisas anteriores mostraram que o uso dos primers ITS e beta-tubulina em PCR de fungos filamentosos geraram uma delimitação correta das espécies na etapa de sequenciamento genético (VISAGIE, 2014; RAJA, 2017; YIN, 2017). Ainda de acordo com Ezeonuegbu et al. (2022), o gene beta-tubulina possui uma variabilidade maior do que a apresentada pela região ITS, tal fato é significativo na determinação da relação filogenética de algumas espécies de fungos.

Figura 11 – Amplicons obtidos a partir da amplificação por PCR do DNA dos isolados utilizando os primers ITS 1 e 4 (a), BT 2a e 2b (b) e BT T1 e T2 (c).



Fonte: Autora (2023).

## 9 CONCLUSÃO

O trabalho possibilitou o desenvolvimento em uma *expertise* não comumente visto em Engenharia, principalmente Engenharia Civil, formação da autora da dissertação. Em relação aos principais resultados, os cinco fungos filamentosos isolados, com base em suas características micro e macroscópicas, provavelmente, pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Cladosporium*, *Epidermophyton*, *Chrysosporium* e *Penicillium*, sendo promissores para a área de tratamento de efluentes. Além disso, foi comprovado que o sistema de tratamento aberto apresenta contaminantes, em especial dos fungos filamentosos e que relações simbióticas podem ser estabelecidas com as microalgas. A extração e amplificação molecular do DNA das espécies foi realizada utilizando-se os primers ITS e beta-tubulina, sendo eficaz.

É importante ressaltar que entender, principalmente durante um cultivo aberto, quais espécies naturalmente realizam simbiose com as microalgas, ajuda a potencializar o processo de tratamento de efluentes. Além disso, a biomassa resultante do co-cultivo pode ter aplicações biotecnológicas interessantes e precisam de estudos de seu aproveitamento. Por fim, espera-se continuar a etapa de sequenciamento do material genético extraído e amplificado, possibilitando o depósito dos espécimes em *databases* e continuação de linhas de pesquisa dentro grupo.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, Flávia Oliveira et al. Characterization of fungi from ruminal fluid of beef cattle with different ages and raised in tropical lignified pastures. **Current microbiology**, v. 69, p. 649-659, 2014.
- ALAMI, Abdul Hai et al. Investigating algae for CO<sub>2</sub> capture and accumulation and simultaneous production of biomass for biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 759, p. 143529, 2021.
- ANUPAMA, S.; PRADEEP, N. V.; HAMPANNAVAR, U. S. Anaerobic followed by aerobic treatment approaches for Spentwash using MFC and RBC. **Sugar Tech**, v. 15, p. 197-202, 2013.
- AHMAD, Talha et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 88, p. 361-372, 2019.
- ASSRESS, Hailemariam Abrha et al. Diversity, co-occurrence and implications of fungal communities in wastewater treatment plants. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 14056, 2019.
- ATAIDES, Daniel et al. Curvularin produced by endophytic *Cochliobolus* sp. G2-20 isolated from *Sapindus saponaria* L. and evaluation of biological activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 12, p. 032-037, 2018.
- AWAD, Mohamed F.; KRAUME, M. Fungal diversity in activated sludge from membrane bioreactors in Berlin. **Canadian journal of microbiology**, v. 57, n. 8, p. 693-698, 2011.
- BALDEV, Edachery et al. Unveiling algal cultivation using raceway ponds for biodiesel production and its quality assessment. **Renewable Energy**, v. 123, p. 486-498, 2018.
- BENTAHAR, Jihed; DESCHÊNES, Jean-Sébastien. Media optimization design towards maximizing biomass production of *Tetrademus obliquus* under mixotrophic conditions. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 100885, 2022.
- BURATTI, Simone et al. Fungal diversity in two wastewater treatment plants in North Italy. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1096, 2022.
- CARVALHO, Fátima; PRAZERES, Ana R.; RIVAS, Javier. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the total environment**, v. 445, p. 385-396, 2013.
- CAROLIN, C. Femina et al. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. **Journal of environmental chemical engineering**, v. 5, n. 3, p. 2782-2799, 2017.
- CULLEN, John J.; MACINTYRE, Hugh L. On the use of the serial dilution culture method to enumerate viable phytoplankton in natural communities of plankton subjected to ballast water treatment. **Journal of applied phycology**, v. 28, p. 279-298, 2016.
- CHEN, Jie et al. A comparative study between fungal pellet-and spore-assisted microalgae harvesting methods for algae bioflocculation. **Bioresource technology**, v. 259, p. 181-190, 2018.

CHEW, Kit Wayne et al. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

DAMASCENO, Raquel Garibaldi. Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes. 2011.

DEMIP- Departamentos de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Identificação de Fungos Filamentosos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: [https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page\\_id=56](https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page_id=56). Acessado em 24 de setembro de 2023.

DENG, Yang; ZHAO, Renzun. Advanced oxidation processes (AOPs) in wastewater treatment. **Current Pollution Reports**, v. 1, p. 167-176, 2015.

DOS SANTOS, Romina Melissa González et al. Avaliação da produção de metabólitos em *Tetrademus wisconsinensis* com utilização de diferentes cores de luz tipo LED RGB. 2021.

EL-BONDKLY, Ahmed MA; EL-GENDY, Mervat MA; BASSYOUNI, Rasha H. Overproduction and biological activity of prodigiosin-like pigments from recombinant fusant of endophytic marine *Streptomyces* species. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, p. 719-734, 2012.

EZEONUEGBU, Blessing Amaka et al. Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 2094, 2022.

FERNÁNDEZ, FG Acién et al. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 8, p. 2721-2732, 2001.

GAMS, Walter. An ex-type culture cannot always tell the ultimate truth. **IMA Fungus**, v. 6, n. 2, p. A69-A69, 2015.

GEWEELY, Neveen SI. Antifungal activity of ozonized olive oil (Oleozone). **Int J Agri Biol**, v. 8, n. 5, p. 671-8, 2006.

GULTOM, Sarman Oktovianus; HU, Bo. Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. **Energies**, v. 6, n. 11, p. 5921-5939, 2013.

HELAL, G. A.; MOSTAFA, M. H.; EL-SAID, M. A. Fungi in the sewage-treatment Zeinein plant, Cairo, Egypt. **J Basic Appl Mycol**, v. 2, p. 69-82, 2011.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; SAMSON, RA3233907. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in mycology**, v. 70, n. 1, p. 1-51, 2011.

JAN, Aarifa et al. Surface sterilization method for reducing microbial contamination of field grown strawberry explants intended for in vitro culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 39, 2013.

JOSHIBA, G. Janet et al. Critical review on biological treatment strategies of dairy wastewater. **Desalination and Water Treatment**, v. 160, p. 94-109, 2019.

KAEPRZAK, M.; WARCHROL, M.; WIDOWSKA, U. In: Environmental Engineering Studies. Springer, p. 167-173, 2003.

KRÜGER, Dirk; SHARMA, Manisha; VARMA, Ajit. Assessing the mycorrhizal diversity of soils and identification of fungus fruiting bodies and axenic cultures. **Symbiotic Fungi: Principles and Practice**, p. 159-188, 2009.

KUSHWAHA, Jai Prakash; SRIVASTAVA, Vimal Chandra; MALL, Indra Deo. An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 51, n. 5, p. 442-452, 2011.

KRULL, Rainer et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112-123, 2013.

RAJA, Huzefa A. et al. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756-770, 2017.

LENG, Lijian et al. Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. **Bioresource technology**, v. 330, p. 125008, 2021.

LIU, Jun et al. Analysis of bacterial, fungal and archaeal populations from a municipal wastewater treatment plant developing an innovative aerobic granular sludge process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 1-8, 2017..

LING, Yun et al. Cultivation of oleaginous microalga *Scenedesmus obliquus* coupled with wastewater treatment for enhanced biomass and lipid production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 148, p. 162-169, 2019.

MAIA, L. C. et al. Menolli Junior N, Medeiros PS, Friedrich RCS, Chikowski RS, Pires RM, Melo RF, Silveira RMB, Urrea-Valencia S. **Cortez VG, Silva VF. Diversity of Brazilian fungi. Rodriguesia**, v. 66, p. 1033-45, 2015.

MATA, Teresa M.; MARTINS, Antonio A.; CAETANO, Nidia S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MITRA, Sukhen et al. Performance and evaluation study of dairy waste water. 2016.

MOHSENPOUR, Seyedeh Fatemeh et al. Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 142168, 2021.

MOREIRA, Antônio Sérgio Nascimento et al. Chemistry and biological activity of Ramalina lichenized fungi. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8952-8987, 2015.

MURPHY, Cormac D. Drug metabolism in microorganisms. **Biotechnology letters**, v. 37, p. 19-28, 2015.

NANCHARAI, Y. V.; REDDY, G. Kiran Kumar. Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. **Bioresource technology**, v. 247, p. 1128-1143, 2018.

NAIRA, Venkateswara R.; DAS, Debasish; MAITI, Soumen K. Real time light intensity based carbon dioxide feeding for high cell-density microalgae cultivation and biodiesel production in a bubble column photobioreactor under outdoor natural sunlight. **Bioresource technology**, v. 284, p. 43-55, 2019.

OLLER, Isabel; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. **Science of the total environment**, v. 409, n. 20, p. 4141-4166, 2011.

PANESAR, Parmjit S. et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food chemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-14, 2007.

PAPAGIANNI, Maria. Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. **J Microb Biochem Technol**, v. 6, n. 4, p. 189, 2014.

PAPAZLATANI, C.V.; KOLOVOU, M.; GKOUNOU, E.E et al. Isolation, characterization and industrial application of a *Cladosporium herbarum* fungal strain able to degrade the fungicide imazalil. *Environmental Pollution*, v. 301, 119030, 2022.

PRAZERES, Ana R.; CARVALHO, Fátima; RIVAS, Javier. Cheese whey management: A review. **Journal of environmental management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

QUEISSADA, Daniel Delgado et al. *Epicoccum nigrum* and *Cladosporium* sp. for the treatment of oily effluent in an air-lift reactor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 607-612, 2013.

REILLY, Matthew et al. Electrocoagulation treatment of dairy processing and slaughterhouse wastewaters. **Energy Procedia**, v. 161, p. 343-351, 2019.

SENANAYAKE, I. C. et al. Morphological approaches in studying fungi: Collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 2678-2754, 2020.

SAJJADI, Baharak et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200-232, 2018.

SAJJADI, Baharak et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 97, p. 200-232, 2018.

SILVA-HUGHES, Alice F. et al. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological research**, v. 175, p. 67-77, 2015.

SOUSA, Gabrielle Cruz Monteiro et al. Aplicações do óleo residual de fritura visando à mitigação de impactos ambientais: uma revisão integrativa. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 8, n. 20, p. 1441-1457, 2021.

SHARMA, Poonam et al. Microbial strategies for bio-transforming food waste into resources. **Bioresource technology**, v. 299, p. 122580, 2020.

TAKAHASHI, Jacqueline A. et al. Filamentous fungi and chemistry: old friends, new allies. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAN, Xin Bei et al. Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 17-30, 2018.

TATOULIS, Triantafyllos I. et al. Aerobic biological treatment of second cheese whey in suspended and attached growth reactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 11, p. 2040-2049, 2015.

TRIPATHI, P.; KUMAR, R. SHARMA, A.K.; MISHRA, A.; GUPTA, P. Pistia statiotes (Jalhumbhi). *Pharmacogn Rev.*, v. 4, n. 8, p. 153-160, 2010.

UMIEJEWSKA, Katarzyna. **Biological anaerobic–aerobic treatment of dairy wastewater in Poland**. Department of Water Supply and Wastewater Treatment, 2017.

ULFIG, K.; KORE, M. Isolation of keratinophilic fungi from sewage sludge. *Sabouradia*, v. 21, n. 3, p. 247-250, 1983.

VIEIRA, Rosana Correia et al. Microalgae as sustainable food: incorporation as strategy in the formulation of functional food. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2020. p. 19-30.

OSWALD, William J.; GOTAAS, Harold B. Photosynthesis in sewage treatment. **Transactions of the American Society of Civil Engineers**, v. 122, n. 1, p. 73-97, 1957.

O'DONNELL, Kerry; CIGELNIK, Elizabeth. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OLSEN, P. E.; SANDA, E. S.; KEYSER, H. H. The enumeration and identification of Rhizobial bacteria in legume inoculant quality control procedures. **NifTAL Center, USA**, v. 96, 1996.

PIEROBON, S. C. et al. Emerging microalgae technology: a review. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 2, n. 1, p. 13-38, 2018.

SARAIVA, Claudety Barbosa et al. Consumo de água e geração de efluentes em uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 10-18, 2009.

- SARAVANAN, A. et al. Strategies for enhancing the efficacy of anaerobic digestion of food industry wastewater: An insight into bioreactor types, challenges, and future scope. **Chemosphere**, v. 310, p. 136856, 2023.
- SONG, Hanwu et al. Enhancing biomass yield, nutrient removal, and decolorization from soy sauce wastewater using an algae-fungus consortium. **Algal Research**, v. 68, p. 102878, 2022.
- WANG, Wang et al. Recent insights into the oxygen-reduction electrocatalysis of Fe/N/C materials. **Acs Catalysis**, v. 9, n. 11, p. 10126-10141, 2019.
- WU, Xiao et al. Anaerobic digestion of dairy manure influenced by the waste milk from milking operations. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 8, p. 3778-3786, 2011.
- YADAV, Ajar Nath et al. (Ed.). **Recent advancement in white biotechnology through fungi: volume 1: diversity and enzymes perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2019.
- YIN, Guohua et al. Characterization of blue mold *Penicillium* species isolated from stored fruits using multiple highly conserved loci. **Journal of fungi**, v. 3, n. 1, p. 12, 2017.
- YU, Kai Ling et al. Microalgae from wastewater treatment to biochar–feedstock preparation and conversion technologies. **Energy conversion and management**, v. 150, p. 1-13, 2017.
- ZHANG, Shaoqing; FAN, Fuqiang; MENG, Fangang. Seasonality and community separation of fungi in a municipal wastewater treatment plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 18, p. e00991-20, 2020.
- ZHANG, Wenguang et al. Effects of exogenous GR24 on biogas upgrading and nutrient removal by co-culturing microalgae with fungi under mixed LED light wavelengths. **Chemosphere**, v. 281, p. 130791, 2021.
- ZNIDARSIC, P., Pavko, A., 2001. A morfologia de fungos filamentosos em cultivos submersos como parâmetro de bioprocesso. *Tecnologia de Alimentos e Biotecnologia* 39, 237–252.1.
- ZHAO, Cheng et al. Synergistic enzymatic and microbial lignin conversion. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1306-1312, 2016.