

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

Gislayne Alves Oliveira

**OZÔNIO FLOTAÇÃO NA COLHEITA DE MICROALGAS  
CULTIVADAS EM EFLUENTE SANITÁRIO**

Santa Maria, RS  
2018



**Gislayne Alves Oliveira**

**OZÔNIO FLOTAÇÃO NA COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM  
EFLUENTE SANITÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Civil.**

Orientador: Prof. Dr. Elvis Carissimi  
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Teixeira Rodrigues

Santa Maria, RS  
2018

Oliveira, Gislayne Alves  
OZÔNIO FLOTAÇÃO NA COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS  
EM EFLUENTE SANITÁRIO / Gislayne Alves Oliveira.- 2018.  
146 p.; 30 cm

Orientador: Elvis Carissimi  
Coorientador: Rafael Teixeira Rodrigues  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Civil, RS, 2018

1. Scenedesmus obliquus 2. Tratamento de Efluente  
Sanitário 3. Recuperação de biomoléculas 4. Tamanho de  
bolhas 5. Coagulação/flocação I. Carissimi, Elvis II.  
Teixeira Rodrigues, Rafael III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo  
autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

**Gislayne Alves Oliveira**

**OZÔNIO FLOTAÇÃO NA COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM  
EFLUENTE SANITÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Civil**.

**Aprovado em 04 de setembro de 2018:**

---

**Elvis Carissimi, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Delmira Beatriz Wolff, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Fernanda de Castilhos, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Liliana Amaral Féris, Dr<sup>a</sup>. (UFRGS)**

---

**Luciane Maria Colla Dr<sup>a</sup>. (UPF)**

---

Santa Maria, RS  
2018



## AGRADECIMENTOS

A batalha não foi fácil e junto com ela tive muito apoio e ajuda, foram muitos momentos de desespero de achar que não ia conseguir. Mas ao final de tudo pude concluir que uma tese não se constrói sozinha. Por isso quero agradecer aqueles que de alguma forma contribuíram com esse trabalho e foram importantes ao longo desses anos.

Agradeço a Deus, por ter me dado sabedoria e força para superar e enfrentar os obstáculos.

À minha família por sempre me apoiar e me incentivar nos meus estudos, principalmente aos meus pais que sempre estiveram do meu lado Aldenice e Silvano e ao meu irmão Rhayner.

À minha segunda família que me apoia desde o mestrado e a quem devo muito por ter chego até aqui, especialmente ao Tio Edi, Dona Ns e as minhas queridas amigas/irmãs Ana Lúcia e Calina Grazielli com quem sempre pude contar.

Ao meu namorado Rafael Cavalheiro que esteve sempre ao meu lado, teve paciência e muita paciência e por ter me apoiado a fazer o doutorado sanduiche no México.

A minha amiga Roberta Kurek que também foi minha família no México, dividimos muitos momentos e solucionamos muitos problemas durante as conversas de almoço.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Elvis Carissimi, que esteve sempre disponível para me ajudar e conversar, não apenas sobre a tese mais também sobre a vida, me incentivou e me encaminhou para experiência no exterior.

Ao Professor Dr. Rafael Teixeira Rodrigues, por ter aceito me coorientar e ter compartilhado de forma generosa seu conhecimento.

A mi tutora Dra. María Teresa Orta Ledesma de la UNAM, por la excelente orientación, por haber aceptado orientarme en un primero momento y segundo por haberme apoyado financieramente para regresar y terminar mi pesquisa de doctorado.

A mi co-tutor Dr. Ignácio Monje por haberme ayudado en la pesquisa y la Mtra Isaura Yáñez mi compañera de cubículo que me ayudó con muchos trámites.

A todos mis compañeros del grupo de investigación del IINGEN, principalmente a colaboración de mis queridos amigos Erick, Tere y Andy que me ayudaron mucho con todas las dudas y también por la amistad, a Regina González que me explico muchas técnicas de laboratorio y a Rebeca Pérez por los cultivos.

Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Laboratorio de Ingeniería Ambiental por la infraestructura disponible para realización del trabajo experimental.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de doutorado e a todos os colegas da Pós-graduação, principalmente a Maria Angélica, Tiago, Fernanda, Jéssica, Gabriel e a Keila.

Ao programa German Academic Exchange Service (DAAD) pela bolsa de estudo por 6 meses na UNAM.

Ao Fundo de Sustentabilidade Energética CONACYT-SENER, projeto 220704, denominado “Nuevas tecnologias para la obtención de Biocombustibles a partir de microalgas cultivadas em aguas residuales” pelo suporte financeiro a pesquisa e pela bolsa concedida por 10 meses.

Agradeço também as professoras Delmira, Fernanda, Liliana e Luciane por aceitarem participar da banca de avaliação.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para chegar até aqui.

**Muito obrigada!**



**Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando a beira-mar,  
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais  
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua  
misterioso diante de meus olhos.**

**Isaac Newton**



## RESUMO

### OZÔNIO FLOTAÇÃO NA COLHEITA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM EFLUENTE SANITÁRIO

AUTORA: Gislayne Alves Oliveira

ORIENTADOR: Elvis Carissimi

COORIENTADOR: Rafael Teixeira Rodrigues

A falta de tratamento dos efluentes sanitários acarreta diversos problemas, tanto de saúde pública como problemas ambientais. E pode ser reduzido utilizando esse efluente sanitário como fonte de nutrientes para crescimento de microalgas. Além de proporcionar o tratamento da água, reduzir custos, as microalgas também podem ser utilizadas para diversos fins, como a produção de biocombustíveis. No entanto, um dos maiores desafios para o uso de microalgas é o método de colheita, por não ser vantajoso em termos de custos. Dentre os métodos de colheita encontram-se a coagulação/flocação e a ozônio flotação. O primeiro é um método de colheita de baixo custo, mas que necessita a adição de coagulantes, geralmente com metais, que podem provocar a contaminação da biomassa colhida restringindo seu uso posterior. A ozônio flotação agrega as propriedades físicas da flotação e a ação oxidante do ozônio que em contato com as células propiciam a colheita, liberam biomoléculas, inclusive as proteínas que são consideradas biosurfactantes reduzindo a possibilidade de coalescência das bolhas de ozônio. A formação das bolhas é um dos parâmetros mais importantes na flotação pois influenciam no tempo de reação na coluna, na probabilidade de colisão e captura das microalgas. O objetivo geral do presente trabalho consistiu em avaliar parâmetros que influem na ozônio flotação em sistema trifásico (efluente sanitário – microalgas – bolhas de ozônio) visando à separação de microalgas cultivadas em água residual para geração de biocombustível. E também, para a ozônio flotação foi determinada a influência da vazão de ozônio, altura da coluna e concentração de biomassa inicial no tamanho das bolhas de ozônio em sistema trifásico (efluente sanitário– microalgas – ozônio). Os resultados mostraram que a microalga *Scenedesmus obliquus* cultivadas em um reator de alta taxa é eficiente na remoção de nutrientes da água residual, obtendo completa remoção de nitrogênio amoniacal, remoção de 93% para nitrogênio total e 61% de ortofosfato. Quanto à comparação entre coagulação/flocação e ozônio flotação, na colheita com ozônio se obteve melhores resultados de qualidade da água para a maioria dos parâmetros ( $\text{NH}_3\text{-N}$ , NTK, nitrato e nitrito), exceto para ortofosfato. Também foi obtida a maior recuperação de lipídeos, carboidratos e proteínas que foram de  $0,32 \pm 0,03$ ,  $0,33 \pm 0,025$  e  $0,58 \pm 0,014$  mg/mg de biomassa. Ao contrário da coagulação/flocação que houve uma menor recuperação de  $0,21$  mg de lipídeos/mg de biomassa e  $0,12 - 0,23$  mg de proteína/mg de biomassa. Quanto à eficiência de colheita para coagulação/flocação foi obtida até 98% utilizando 2 g de sulfato de alumínio/ L e para ozônio flotação se obteve até 91.5% quando aplicado uma concentração de  $\text{O}_3$  de  $0,16$  mg de  $\text{O}_3$ /mg de biomassa. A vazão de ozônio, a altura na coluna à qual foram capturadas as imagens e a concentração inicial de microalgas interfere diretamente no tamanho das bolhas, assim como na oxidação das células de microalgas e na transferência de  $\text{O}_3$ . A ação das proteínas como biosurfactantes, reduziram o tamanho das bolhas, ou seja, quanto maior foi a concentração de biomassa inicial na coluna maior a liberação de proteínas e assim menor foram os tamanhos das bolhas obtidas para todas as vazões de ozônio avaliadas ( $0,2$ ,  $0,6$  e  $1$  L/min).

**Palavras-chave:** *Scenedesmus obliquus*. Tratamento de Efluente Sanitário. Recuperação de biomoléculas. Tamanho de bolhas. Coagulação/flocação.



## ABSTRACT

### OZONE FLOTATION OF HARVESTING MICROALGAE CULTIVATED IN SANITARY EFFLUENT

AUTHOR: Gislayne Alves Oliveira

ADVISOR: Elvis Carissimi

CO-ADVISOR: Rafael Teixeira Rodrigues

The lack of treatment of sanitary effluents causes several problems, both public health and environmental problems. And it can be reduced by using this sanitary effluent as a source of nutrients for microalgae growth. In addition to providing water treatment, reduce costs, microalgae can also be used for various purposes, such as the production of biofuels. However, one of the major challenges for the use of microalgae is the harvest method, as it is not cost-effective. Among the harvest methods are coagulation/flocculation and ozone flotation. The first is a low-cost harvesting method, but requires the addition of coagulants, usually with metals, that can cause contamination of the harvested biomass by restricting its subsequent use. The ozone flotation adds the physical properties of the flotation and the oxidizing action of the ozone that in contact with the cells propitiates the harvest, liberate biomolecules, including the proteins that are considered biosurfactantes reducing the possibility of coalescence of the ozone bubbles. The formation of bubbles is one of the most important parameters in flotation because they influence the reaction time in the column, the probability of collision and capture of the microalgae. The general objective of the present work was to evaluate parameters that influence ozone flotation in a three - phase system (sanitary effluent - microalgae - ozone bubbles) aiming at the separation of microalgae grown in residual water for biofuel generation. Also, for ozone flotation, the influence of ozone flow, column height and initial biomass concentration on the size of the ozone bubbles in a three - phase system (sanitary effluent - microalgae - ozone) was determined. The results showed that the microalgae *Scenedesmus obliquus* grown in a high-rate reactor is efficient in the removal of nutrients from the residual water, obtaining complete removal of ammoniacal nitrogen and removal of 93% for total nitrogen and 61% of orthophosphate. As for the comparison between coagulation/flocculation and ozone flotation, the best results of water quality for most parameters ( $\text{NH}_3\text{-N}$ , NTK, nitrate and nitrite) were obtained in the ozone harvest, except for orthophosphate. It was also obtained the highest recovery of lipids, carbohydrates and proteins that were  $0,32 \pm 0,03$ ,  $0,33 \pm 0,025$  and  $0,58 \pm 0,014$  mg/mg of biomass. Unlike coagulation/flocculation, there was a lower recovery of  $0,21$  mg of lipids/mg of biomass and  $0,12 - 0,23$  mg of protein/mg of biomass. Concerning the efficiency of harvesting for coagulation/flocculation up to 98% was obtained using 2 g of aluminum sulfate/L and for ozone flotation it was obtained up to 91.5% when an  $\text{O}_3$  dose of  $0,16$  mg of  $\text{O}_3$ /mg of biomass was applied. The ozone flow, the height in the column to which the images were captured and the initial concentration of microalgae directly interfere with the size of the bubbles, as well as the oxidation of the microalgae cells and the transfer of  $\text{O}_3$ . The action of the proteins as biosurfactants reduced the size of the bubbles, ie, the higher the initial biomass concentration in the column the higher the protein release and thus the lower the bubble sizes obtained for all ozone flows (0.2, 0.6 and 1 L/min).

**Keywords:** *Scenedesmus obliquus*. Wastewater Treatment. Biomolecules recovery. Bubble size. Coagulation/flocculation.



## LISTA DE FIGURAS

### APRESENTAÇÃO

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Número de publicações por ano utilizando como palavras-chave colheita de microalga e biocombustível (do inglês <i>harvesting of microalgae, biofuel</i> ). .... | 24 |
| Figura 2 - Mecanismo de colisão, adesão, e captura de partículas por bolhas de ar. ....  | 29 |
| Figura 3 - Determinação de <i>hold up</i> por diferença de pressão em coluna de flotação. ....   | 32 |
| Figura 4 - Aspecto das células da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> BR003. (a) antes da ozonização; (b) após 10 min; (c) 20 min e (d) 50 min após a ozonização. ....   | 35 |
| Figura 5– Diagrama esquemático do modelo de transferência de gás “teoria dos dois filmes”. ....  | 37 |
| Figura 6 – Estrutura da dupla camada elétrica de íons e a força líquida entre células de microalgas de carga similar. ....   | 41 |
| Figura 7- Esquema dos processos de conversão energética utilizados no processamento de microalgas.....   | 49 |
| Figura 8- Cadeia produtiva de biodiesel a partir de microalgas cultivadas em água residual. ..   | 50 |
| Figura 9- Diagrama da metodologia experimental para desenvolvimento da investigação. ....  | 51 |
| Figura 10- Microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> utilizada para os ensaios de laboratório, com aumento de 20x.....   | 54 |
| Figura 11- Cultivo de microalgas em recipientes PET mantidas em laboratório.....   | 54 |
| Figura 12- Cultivo de microalgas em reator de alta taxa (Raceway) com iluminação direta (24 horas). ....   | 55 |
| Figura 13– Jar test com 1 L de <i>Scenedesmus obliquus</i> utilizado para os testes de coagulação/flocação. ....   | 56 |
| Figura 14– Cone de Imhoff na etapa de sedimentação da biomassa. ....   | 57 |
| Figura 15- Esquema do aparato experimental de colheita de microalgas por ozônio flotação. ....   | 59 |
| Figura 16 - Configuração experimental para determinar a distribuição e tamanho das bolhas de ozônio na colheita de microalgas por ozônio flotação. ....                    | 65 |

### ARTIGO 1

|   |    |
|---|----|
| Figure 1. Growth in wastewater and consumption of ammonia nitrogen and orthophosphates of <i>Scenedesmus</i> sp. from a Raceway reactor. ....   | 96 |
| Figure 2. Effect of $Al_2(SO_4)_3$ dose and biomass of coagulation-flocculation: A. recovery of biomass, B. recovery of lipid per biomass, and C. recovery of carbohydrates per biomass. ....                                   | 97 |
| Figure 3. Ozone dose of 0.14 mg $O_3$ /mg biomass: recovery of biomass (A), recovery of lipid per biomass (B) and recovery of carbohydrate per biomass (C) versus ozone flow and biomass of ozone-flotation, respectively. .... | 98 |

### ARTIGO 2

|   |     |
|---|-----|
| Fig. 1 Example of the obtained photograph by ozone-flotation to determine bubble size....         | 102 |
| Fig. 2 Experimental setup for testing ozone-flotation to determine bubble size distribution. .... | 103 |

|   |     |
|---|-----|
| Fig. 3 Average diameter of ozone bubble size at three heights (bottom, middle and top) in triplicate measured 900 bubbles the column and protein release with three ozone flow rates in ozone flotation.....                                | 105 |
| Fig. 4 The relative frequency of bubble size distribution and Sauter mean diameter (D) in three heights in the column (bottom, middle and top) with ozone flows of 0.2 (A), 0.6 (B) and 1 L/min (C) in triplicate measured 900 bubbles..... | 106 |
| Fig. 5 The cumulative relative frequency of bubble size distribution in three heights in the column with ozone flows 0.2 (A), 0.6 (B) and 1 L/min (C) in triplicate measured 900 bubbles.....   | 107 |
| Fig. 6 Percentage of transferred O <sub>3</sub> , oxidized biomass and biomass harvested in relation to ozone flow, and determination of proteins in biomass (SD < 0.08). .....   | 108 |
| Fig. 7 Cells of <i>Scenedesmus</i> sp. before the application of ozone flotation with 40x magnification (A) and after application with a flow of 0.6 L/min 100x magnification (B). .....  | 108 |
| Fig. 8 Zeta potential after ozone-flotation. ....   | 109 |

### **ARTIGO 3**

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1. Experimental setup used to determine bubble size distribution and harvesting of microalgae by ozone-flotation. ....  | 119 |
| Figure 2. Average diameter of the ozone bubbles and standard deviation at three biomass concentrations and three ozone flows. ....   | 121 |
| Figure 3. Release of proteins in the ozone-flotation column with different concentrations of <i>Scenedesmus obliquus</i> . ....  | 122 |
| Figure 4. Cumulative relative frequency for three ozone flows and three initial biomass concentrations. ....   | 123 |
| Figure 5. Effect of initial biomass and ozone flow: A. harvested biomass, B. oxidized biomass, and C. transferred ozone. ....  | 125 |
| Figure 6. Viscosity of water after harvesting of microalgae by ozone flotation with different initial biomasses (A: 500 mg/L; B: 700 mg/L and C: 1000 mg/L) and ozone flows as a function of shear rate..... | 128 |

## LISTA DE TABELAS

### **APRESENTAÇÃO**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Comparação entre bolhas de diferentes tamanhos.....  | 33 |
| Tabela 2 - Composições bioquímicas de microalgas em matéria seca (%). ....                                | 46 |
| Tabela 3- Resumo dos dados utilizados para cada artigo.....   | 52 |
| Tabela 4 - Métodos utilizados para determinar os parâmetros físico-químicos das amostras de água.....     | 53 |
| Tabela 5- Condições de funcionamento das etapas de coagulação/flocação e sedimentação. ....               | 57 |
| Tabela 6- Matriz do planejamento experimental de coagulação/flocação. ....                                | 58 |
| Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental da vazão O <sub>3</sub> e biomassa.....                    | 60 |
| Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental da vazão de O <sub>3</sub> e altura da coluna. ....        | 60 |
| Tabela 9- Matriz do planejamento experimental do vazão de O <sub>3</sub> e concentração de biomassa. .... | 62 |

### **ARTIGO 1**

|  |    |
|--|----|
| Table 1 Characteristics of influent and effluent with cultivation and growth of <i>Scenedesmus</i> sp. ....                                    | 90 |
| Table 2 Coagulation-flocculation conditions used by different studies for the harvesting of microalgae biomass. ....                           | 92 |
| Table 3 Removal of nutrients by coagulation-flocculation after pre-treatment with <i>Scenedesmus</i> sp.....                                   | 93 |
| Table 4 Removal of nutrients by ozone-flotation after pre-treatment with <i>Scenedesmus</i> sp. ..   | 94 |
| Table 5 Experimental significance of tested variables in coagulation-flocculation and ozone-flotation. The confidence level used was 95% ..... | 95 |

### **ARTIGO 2**

|  |     |
|--|-----|
| Table 1 Statistical results for ozone fluxes and column heights analyzed. .... | 105 |
|--|-----|

### **ARTIGO 3**

|   |     |
|---|-----|
| Table 1. Ozone-flotation conditions used by different studies for the harvesting of microalgal biomass..... | 127 |
|---|-----|



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>AGRADECIMENTOS.....</b>  | 7  |
| <b>RESUMO .....</b>   | 11 |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | 13 |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>   | 15 |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>  | 17 |
| <b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>   | 21 |
| 1.1    JUSTIFICATIVA.....   | 23 |
| 1.2    OBJETIVO.....  | 26 |
| 1.3    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 26 |
| 1.4    REVISÃO DE LITERATURA .....  | 27 |
| 1.4.1 Flotação em coluna.....   | 27 |
| 1.4.2    Coagulação/flocação .....  | 40 |
| 1.4.3    Tamanho de bolhas por análise de imagem .....  | 43 |
| 1.4.4    Tratamento de água residual mediante o uso de microalgas .....   | 44 |
| 1.4.5    Microalgas como fonte de biocombustível .....  | 48 |
| 1.5    MATERIAL E MÉTODOS .....   | 51 |
| 1.5.1 Caracterização da água residual e qualidade da água.....  | 53 |
| 1.5.2    Cultivo e crescimento de microalgas .....  | 53 |
| 1.5.3    Colheita por coagulação/flocação .....   | 56 |
| 1.5.4    Colheita por ozônio flotação.....  | 58 |
| 1.5.5    Análises de biomoléculas .....   | 63 |
| 1.5.6    Método de análise de imagem.....   | 64 |
| <b>2. Artigo 1 - Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for<br/>Scenedesmus microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a High-<br/>Rate Algal Pond.....</b> | 66 |
| Abstract.....   | 67 |
| 1. Introduction .....   | 67 |
| 2. Materials and methods.....   | 70 |
| 2.1 <i>Cultivation of Scenedesmus sp. in wastewater .....</i>   | 71 |
| 2.2 <i>Harvesting of Scenedesmus sp. ....</i>   | 71 |
| 2.3 <i>Water quality.....</i>   | 73 |
| 2.4 <i>Biomolecules .....</i>   | 73 |
| 2.5 <i>Statistical analysis .....</i>   | 74 |
| 3. Results and discussion.....  | 74 |
| 3.1 <i>Growth and wastewater treatment by Scenedesmus sp. ....</i>  | 74 |
| 3.2 <i>Biomass and biomolecule recovery.....</i>  | 76 |
| 3.3 <i>Nutrient removal efficiency by coagulation-flocculation and ozone-flotation .....</i>  | 80 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>4. Conclusions .....</b>   | 82  |
| <b>Acknowledgements .....</b>   | 82  |
| <b>References .....</b>   | 83  |
| <b>3. Artigo 2 – The effect of bubble size distribution on the release of microalgae proteins by ozone-flotation.....</b>   | 99  |
| <b>Introduction .....</b>   | 99  |
| <b>Materials and Methods .....</b>  | 101 |
| <b>Results.....</b>   | 104 |
| <b>Discussion.....</b>  | 109 |
| <b>Conclusions .....</b>  | 111 |
| <b>Acknowledgements .....</b>   | 111 |
| <b>References .....</b>   | 111 |
| <b>4. Artigo 3 – Harvesting microalgae by ozone-flotation: influence of microalgae biomass concentration on bubble size distribution and separation efficiency.....</b> | 115 |
| INTRODUCTION .....  | 115 |
| MATERIALS AND METHODS .....   | 117 |
| <b>Microalgae cultivation in wastewater and a high rate algal pond (HRAP) .....</b>   | 117 |
| <b>Evaluation of ozone-flotation for microalgae harvesting.....</b>   | 118 |
| <b>Ozone bubble size determination .....</b>  | 118 |
| <b>Rheological properties.....</b>  | 120 |
| <b>Proteins.....</b>  | 120 |
| RESULTS AND DISCUSSION.....   | 120 |
| <b>Influence of microalgae biomass concentration on bubble size distribution .....</b>  | 120 |
| CONCLUSIONS .....   | 128 |
| REFERENCES .....  | 129 |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>   | 134 |
| <b>6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES .....</b>   | 137 |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | 139 |

## 1. APRESENTAÇÃO

Várias técnicas de colheita de microalgas visando à produção de biocombustíveis estão sendo estudadas, a fim de reduzir os custos e aumentar a eficiência de colheita e extração de lipídeos e carboidratos. Uma dessas técnicas é a aplicação de ozônio flotação, a qual baseia-se na remoção de partículas do meio líquido a partir da injeção de bolhas de ozônio no sistema. Estas bolhas aglomeradas às células de microalgas acarretam a flotação dos agregados.

Essa técnica apresenta como uma das principais vantagens utilizar dois processos em apenas um, além da separação física das partículas pela emissão de bolhas (flotação) ocorre também o processo de oxidação de compostos orgânicos, devido ao forte potencial de oxidação do ozônio. Wilinski e Naumczyk (2012) relatam alguns resultados positivos com a aplicação de ozônio flotação, como a redução na dosagem de coagulantes e floculantes, remoção de patógenos, melhor biodegradabilidade das águas residuárias, remoção de micro-poluentes (antibióticos, hormônios, produtos de higiene pessoal) e diminuição da quantidade de lodo biológico em excesso (no caso da unidade de ozônio flotação ser utilizada para a separação de efluentes com excesso de lodo ativado).

A ozônio flotação está sendo estudada e aplicada em diversos campos, como no tratamento da água potável (LEE et al., 2009), tratamento de águas residuais de tintura industrial (KIM; KIM; LEE, 2011), águas residuais (LEE et al., 2008) águas residuais de gado (LEE e SONG, 2006), colheita de microalgas (KOMOLAFE et al., 2014; VELASQUEZ-ORTA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018), entre outros.

Outra técnica utilizada e convencional, consiste na coagulação/flocação, por ter alta eficiência de colheita e apresentar baixo custo de aplicação. A coagulação/flocação é utilizada para reduzir ou neutralizar as cargas superficiais das células, que são carregadas negativamente, com a aplicação de agentes químicos, resultando na agregação das células entre si, formando flocos e possibilitando sua remoção. Tradicionalmente, o líquido a ser tratado é pré-tratado com coagulantes, geralmente coagulantes catiônicos de íons Fe ou Al, para aumentar o tamanho dos agregados de algas (EDZWALD, 2010; HENDERSON; PARSONS; JEFFERSON, 2008). Contudo, a combinação de flocação e flotação pode ser problemática. Se os flocos produzidos se tornarem muito grandes, eles são mais propensos a se desprender, exigindo vários acessórios de bolha para reduzir o aumento da densidade causada pela flocação (EDZWALD, 2010). Já para a sedimentação, flocos grandes tendem a ser mais vantajosos.

A utilização de microalgas como fonte para geração de biocombustível tem se destacado por ser uma matéria prima renovável No entanto, busca-se uma forma eficiente de colheita e

extração de lipídeos e carboidratos. A tecnologia empregada para a recuperação de microalgas tem o efeito mais influente na economia de produção de microalgas (DANQUAH et al., 2009; BRENNAN e OWENDE, 2010). Entretanto, a maioria dos métodos de colheita não é suficientemente eficaz em termos de custos (COWARD; LEE; CALDWELL, 2013; SHARMA et al., 2013). A coagulação/flocação podem, contudo, proporcionar recuperações de biomassa de microalgas elevadas a custos razoáveis (GRIMA et al., 2003), porém necessita da adição de produtos químicos.

Microalgas são de particular interesse porque muitos de seus recursos requeridos para cultivo em massa pode ser fornecido por águas residuais (RAWAT et al., 2011; STURM e LAMER, 2011), dióxido de carbono dos gases de combustão (BRENTNER; ECKELMAN; ZIMMERMAN, 2011; WANG et al., 2008), seu crescimento em água residual favorece a remoção de nutrientes e metais (CHRISTENSON e SIMS, 2011), e porque as células de microalgas sintetizam muitos bioproductos diferentes, que podem ser colhidos com uma grande variedade de composição e usos (MENETREZ, 2012), além de algumas espécies serem excelentes produtoras de lipídeos e carboidratos, que podem ser utilizados para a geração de biocombustível.

Na aplicação de ozônio flotação, avaliar algumas variáveis no processo, como o tamanho e a distribuição das bolhas na câmara de flotação, é de suma importância para se obter uma boa eficiência na colheita de microalgas e ação do ozônio nas células provocando a lise celular e favorecendo a liberação de proteínas e extração de lipídeos e carboidratos. Essas são influenciadas principalmente pela vazão e a concentração de ozônio, parâmetros importantes na determinação da distribuição do tamanho das bolhas. Além da influência da concentração de microalgas, que a partir da aplicação do ozônio ocorre a liberação de proteínas, como descrito por González et al. (2016) as proteínas liberadas pelas microalgas exibem atividade surfactante, logo reduzem a tensão superficial das bolhas, evitando assim o processo de coalescência.

A eficiência da flotação depende basicamente da colisão bem sucedida e da ligação de bolhas/partículas, além de funcionar melhor quando as células algais forem hidrofóbicas (GARG et al., 2012; HENDERSON; PARSONS; JEFFERSON, 2009). O subprocesso de colisão começa a partir da aproximação de uma partícula para encontrar uma bolha que é governada pelo fluxo de líquido e pelo movimento relativo entre a bolha e a partícula. As trajetórias de partículas/bolhas determinam se um encontro ocorrerá (BRABCOVÁ, 2015).

As bolhas executam uma gama de funções dentro do processo. No interior do reservatório líquido, o movimento de bolhas facilita a mistura e, portanto, aumenta a probabilidade de interação bolha/algas (WONG; HOSSAIN; DAVIES, 2001), as bolhas

fornecem a interface para a ligação da célula de microalgas e transportam as microalgas ligadas para a interface espuma-líquido (COWARD; LEE; CALDWELL, 2015).

Uma forma eficaz de melhorar a interação, a ligação e as eficiências de estabilidade na relação bolha/microalga é reduzir o tamanho das bolhas, aumentando assim a área de superfície por unidade de volume e aumentando a probabilidade de interação entre bolhas e algas (HANOTU; BANDULASENA; ZIMMERMAN, 2012; PAHL et al., 2013).

Dentre os métodos utilizados para determinar o tamanho de bolhas, destacam-se técnicas que empregam sensores óticos, eletrorresistividade e análises de imagens. Mesmo com várias técnicas, o alto custo dos equipamentos e suas limitações, restringem a determinação das bolhas.

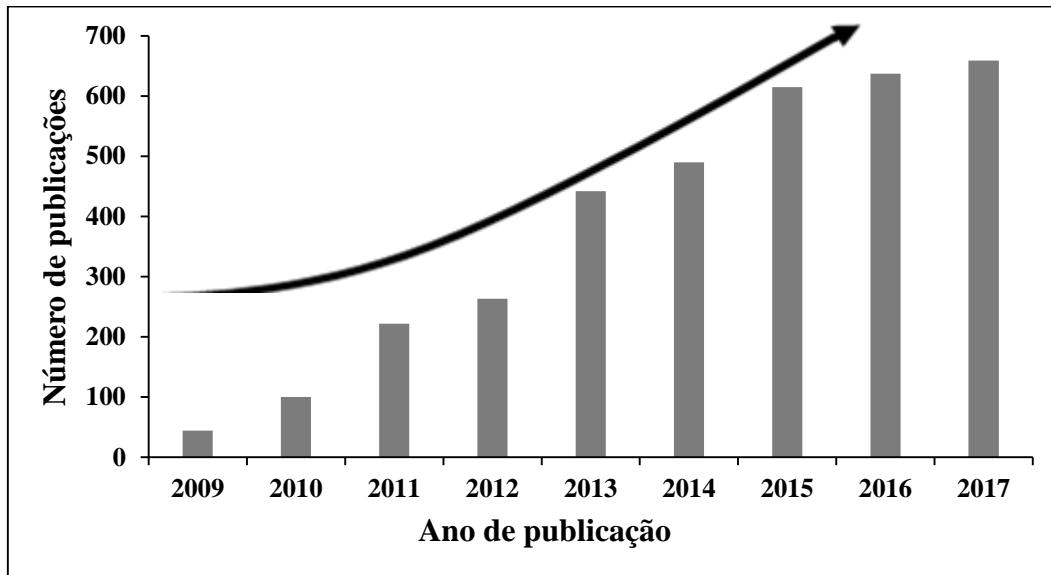
Apesar das dificuldades impostas para determinar a distribuição e o tamanho de bolhas de ozônio em um sistema trifásico, ou seja, na presença de microalgas, água residual e bolhas de ozônio, a sua identificação é determinante para o melhor entendimento da ozônio flotação, como já destacado.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O cultivo de microalgas em água residual promove a remoção de nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), presentes na água que causam diversos problemas quando lançados sem tratamento nos corpos hídricos. Essas águas residuais quando são tratadas de forma convencional geram custos e o cultivo de microalgas é uma grande vantagem, por ser um tratamento de baixo custo na remoção desses nutrientes, além de posterior uso de microalgas como fonte para a produção de biocombustível. No entanto, devido ao alto volume de água com as células de microalgas, o método de colheita aplicado é de fundamental importância nesse processo. Busca-se a máxima extração de lipídeos e carboidratos e quando aplicado a técnica de ozônio flotação, a liberação de proteínas é fundamental para estabilização das bolhas de ozônio.

Como justificativa desta tese de doutorado, a Figura 1 apresenta a evolução de publicações que relatam sobre a temática colheita de microalgas para produção de biocombustível. Diante do exposto, pode-se observar o crescente interesse científico por este tema, devido principalmente à busca por novas fontes de biocombustível e a preocupação com os métodos de colheita.

Figura 1 - Número de publicações por ano utilizando como palavras-chave colheita de microalga e biocombustível (do inglês *harvesting of microalgae, biofuel*).



Fonte: Base de dados *Science Direct* (2018).

O uso da flotação para a colheita de microalgas é uma operação eficiente, devido muitas espécies de microalgas terem se adaptado para aumentar sua capacidade de flutuação (ESTEVES, 1998), sendo assim já tendem a flotar. Na flotação convencional é necessária a aplicação de coagulantes ou floculantes em etapas anteriores (coagulação e flocação), para modificar a interface hidrofílica das células de microalgas possibilitando sua aglomeração. Já na ozônio flotação o ozônio é quem cumpre esse papel.

Uma das variáveis físicas determinantes para a eficiência do sistema é a distribuição e tamanho das bolhas, que influenciam a ação de captura de partículas pelas bolhas. Normalmente, na câmara de flotação as bolhas tendem a se coalescer, flotando mais rápido e diminuindo a remoção das partículas. Para que a flotação seja bem-sucedida, as células ou as partículas devem ser hidrofóbicas, isto pode ser alcançado através da adição de tensoativos ou coagulante (GERARDO et al., 2015). A presença de moléculas tensoativas alteram as propriedades dinâmicas da interface e, consequentemente, afetam o tamanho das bolhas e a estabilidade da espuma durante a flotação (CHO e LASKOWSKI, 2002). Essa adição melhora a separação de partículas, aumentando o contato entre o ar e a partícula sólida e aumentando a probabilidade de se aderirem (UDUMAN et al., 2010).

A adição de surfactantes ocasiona possível contaminação da biomassa colhida, não sendo um procedimento eficiente quando se utiliza essa biomassa para a produção de

biocombustível. E a ozônio flotação é um método alternativo de colheita de microalgas, que foi relatado pela primeira vez na década de 1980 (BETZER; ARGAMAN; KOTT, 1980). Nesse caso a aplicação do ozônio oxida as células liberando proteínas que agem como biosurfactantes, reduzindo a carga superficial das células e evitando a coalescência das bolhas, além de aumentar a extração de lipídeos e carboidratos devido sua ação oxidante.

Velasquez-Orta et al. (2014) relataram a eficiência da ozônio flotação para colher microalgas, sendo dobrada a quantidade de lipídeos extraídos e FAME (ésteres metílicos de ácidos graxos) recuperados da biomassa. Além de reforçar a estabilidade oxidativa do biodiesel devido ao efeito que o ozônio teve no grau de FAME saturação.

A produção de biocombustíveis a partir de células algais requer a extração de lipídeos e carboidratos de células cultivadas e isto pode ser alcançado por lise de células com ozônio. A espécie utilizada nesse estudo é a *Scenedesmus obliquus*, de acordo com Mandal e Mallick (2009) essa espécie possui alto potencial de captura de CO<sub>2</sub> e produção de lipídeos adequados para a produção de biodiesel. Outra vantagem é utilizar como fonte de nutriente água residual para o cultivo das microalgas, principalmente nitrogênio e fósforo que são os principais para o seu crescimento, reduzindo assim a carga de nutrientes para os corpos d'água receptores.

Na ozônio flotação as proteínas liberadas a partir da matéria orgânica algogênica fortemente ligadas, são essenciais para modificar a hidrofobicidade das superfícies das bolhas, para fácil ligação de células e para formar uma camada de espuma superior para recolher células flutuantes (CHENG, YA et al., 2011).

A estrutura frágil das bolhas e a possibilidade de aglutinação das mesmas constituem as principais causas da deformação da bolha, alterando os resultados quando se utiliza extração de amostras. Entretanto, a aplicação da tecnologia de câmeras digitais facilitou seu uso, permitindo uma reflexão sobre seu potencial de utilização na avaliação de bolhas. Portanto, nesse trabalho foi realizado determinação do tamanho das bolhas em movimento (modo on-line), sem extração de amostras, sistema trifásico (água residual, microalga e bolhas de ozônio) e por meio de análise de imagem digital.

Alguns autores avaliaram a formação do tamanho das bolhas de ar em diferentes processos e com diferentes objetivos de remoção, Reis e Barrozo (2016) aplicaram a flotação na remoção de apatita, Coward; Lee; Caldwell (2015) utilizaram a flotação de espuma para colheita de microalgas, Maldonado et al. (2015) avaliaram em coluna de flotação, Vazirizadeh; Bouchard; Chen (2016) utilizaram a flotação com efeitos em partículas sólidas, Englert (2008) avaliou por flotação por ar dissolvido, Cunha et al. (2007) avaliaram a flotação de partículas de quartzo com diferentes tamanhos de bolhas e Rodrigues (2004) desenvolveu uma técnica

para caracterizar as bolhas utilizando a flotação. Porém a maioria destes autores avaliaram o tamanho de bolhas relacionado a partículas finas de minérios. Até o presente momento não foram encontrados trabalhos que reportaram a relação do tamanho das bolhas geradas pelo ozônio flotação em um sistema trifásico para a colheita de microalgas em diferentes vazões de ozônio avaliando o efeito das proteínas na coalescência das bolhas de ozônio, tão pouco a influência da concentração de biomassa inicial, visando à colheita de microalgas e extração de biomoléculas para geração de biocombustível.

## 1.2 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em avaliar parâmetros que influem na ozônio flotação em sistema trifásico (efluente sanitário – microalgas – bolhas de ozônio) visando à separação de microalgas cultivadas em água residual para geração de biocombustível.

## 1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

1. Analisar a eficiência do sistema (cultivo-colheita) no tratamento de águas residuais;
2. Comparar ozônio flotação e coagulação/flocação quanto a qualidade da água, colheita de microalgas e extração de biomoléculas (lipídeos, carboidratos e proteínas);
3. Aplicar a técnica para a determinação do tamanho das bolhas formadas por ozônio durante a colheita de microalgas, mediante aquisição e processamento de imagens em sistema trifásico on-line;
4. Avaliar os efeitos da vazão de ozônio, concentração inicial de biomassa e altura da coluna de flotação no tamanho das bolhas;
5. Analisar o efeito da liberação de proteínas na coalescência das bolhas de ozônio;
6. Avaliar a influência da vazão de ozônio no potencial zeta das células;
7. Avaliar a eficiência do processo em diferentes condições de colheita em escala de laboratório;

## 1.4 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.4.1 Flotação em coluna

A técnica de flotação é uma operação unitária físico-química para separação de partículas de um fluído pela inserção de bolhas de gás, geralmente se utiliza o ar. Essas bolhas formadas se juntam às partículas quando as mesmas têm sua carga neutralizada por agentes químicos (coagulantes), facilitando a probabilidade de adesão das bolhas às partículas. Devido à diferença de densidade entre as bolhas e o fluido, ocorre a flotação do material particulado até a superfície, onde são removidos.

Diversas são as aplicações da flotação, por exemplo, em processos relacionados ao meio ambiente, no tratamento de efluentes contendo material orgânico ou metais pesados, tratamento de água para separação-remoção de micro-organismos e odor, em processos industriais como a separação de proteínas, remoção de óleos emulsificados, espessamento de lodos, reuso de águas de processo, beneficiamento mineral, dentre outros (RUBIO; SOUZA; SMITH, 2002).

A etapa de flotação é complexa, por envolver três fases (sólido, líquido, gasoso) e se baseia na capacidade de uma partícula dentro de um meio líquido aderir a uma interface. Na coluna de flotação, o meio líquido composto por partículas entra em contato com bolhas injetadas no fundo da célula de flotação, visando à separação total das partículas. Antes de sua introdução na coluna, o meio é geralmente condicionado com substâncias químicas adequadas, tornando a superfície das partículas hidrofóbicas, as partículas que exibem superfícies hidrófobas, assim, se unem às bolhas de ar ascendentes (RIQUELME et al., 2015). Esses agregados bolhas-partículas formam uma espuma na parte superior da coluna que então é removida.

Na coluna de flotação são utilizados equipamentos de simples operação, que possuem uma alta taxa de transferência de massa e calor, compactade e baixos custos, mas que apresentam uma fluidodinâmica muito complexa (KANTARCI; BORAK; ULGEN, 2005). Os estudos nesse equipamento se concentram nos regimes de operação, e de que forma influem na fluidodinâmica das fases. Os experimentos em coluna de flotação se concentram principalmente nos efeitos geométricos, no *hold up* e na influência de tamanho de bolhas que são parâmetros importantes na hidrodinâmica do processo (VAZIRIZADEH; BOUCHARD; CHEN, 2016). A distribuição e o tamanho médio das bolhas são parâmetros responsáveis pela eficiência de coleta e de transporte das partículas, onde o tamanho médio ideal de bolhas é função do tamanho médio das partículas, e nas colunas de flotação variam de 0,5 a 2,0 mm (PENNA et al., 2003).

A eficiência de captura bolha-partícula pode ser definida como a razão entre o número de partículas capturadas por uma bolha e o número total de partículas existentes no volume deslocado pelo movimento (ascendente) da mesma (LEGENDRE; SARROT; GUIRAUD, 2009; SARROT; GUIRAUD, LEGENDRE, 2005). Desta forma, a eficiência de captura bolha-partícula equivale à probabilidade de que uma partícula qualquer dentro do volume deslocado pela bolha forme um agregado permanente (estável) com a mesma (RALSTON; DUKHIN; MISHCHUK, 2002).

#### *1.4.1.1 Influência e mecanismo da flotação*

Para geração de bolhas em coluna de flotação, utilizam-se difusores com orifícios de pequeno diâmetro que tem a finalidade de distribuir pequenas bolhas na coluna. A captura de uma partícula por uma bolha ascendente envolve diversos fatores cinéticos.

O processo de recuperação das partículas na flotação apresentadas por Schuhmann (1942) são descritas em termos das probabilidades de colisão e adesão das bolhas de ar as partículas, e as mesmas são aprisionadas pelas bolhas e arrastadas a superfície para posterior remoção (Equação 1).

$$P = P_c * P_a * P_s \quad (1)$$

P = Probabilidade de flotação;

$P_c$ = Probabilidade de colisão bolha-partícula;

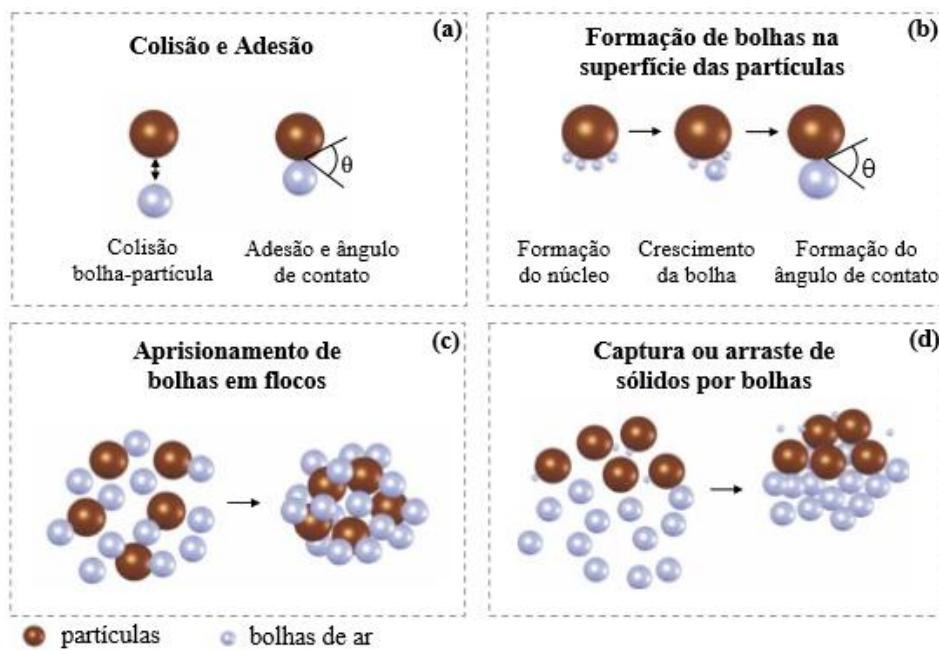
$P_a$ = Probabilidade de adesão bolha-partícula;

$P_s$ = Fator de estabilidade do agregado bolha-partícula.

A compreensão da interação bolha-partícula é fundamental para o bom funcionamento da flotação, sendo que cada probabilidade depende de fatores diferentes para atingir o objetivo, completa separação das partículas do líquido.

No caso da ozônio flotação de microalgas, um dos mecanismos mais importantes é a adesão das células de microalgas às bolhas de ozônio, e, portanto para que essa interação aconteça é necessária a liberação das proteínas (biosurfactantes), que causam a redução da energia superficial das células (potencial zeta) para possibilitar uma melhor adesão das microalgas às bolhas de ozônio. Na Figura 2 é apresentado de forma simples o mecanismo que ocorre na recuperação de partículas por flotação.

Figura 2 - Mecanismo de colisão, adesão, e captura de partículas por bolhas de ar.



Fonte: FÉRIS, 2001.

A colisão de uma partícula com uma bolha é influenciada por diversos fatores, principalmente físicos como o tamanho da partícula e da bolha, a densidade e também por fatores hidrodinâmicos como destacado por Derjaguin e Dukhin (1961) as forças de arraste, a viscosidade, forças de inércia, gravidade, além de difusão e forças eletroforéticas, influenciam na colisão partícula-bolha.

Diversos modelos matemáticos existentes na literatura descrevem a etapa de colisão bolha-partícula, alguns são apresentados por Meyer e Deglon (2011) que vão desde modelos simplistas a modelos altamente desenvolvidos que tentam incluir interações complexas de partículas e fluidos. De acordo com os autores a análise experimental dos processos de colisão é difícil, devido principalmente à complexidade do campo de fluxo do fluido, onde as colisões ocorrem nas regiões hidrodinâmicas (Stokes, potencial e regime intermediário), por mecanismos de interceptação, influências iniciais ou gravitacionais.

O processo de adesão bolha-partícula é função do tempo de contato e fixação que ocorre após a colisão, isso devido principalmente ao ângulo de contato partícula-bolha que quanto maior o ângulo, mais eficiente é a adesão. Essa etapa pode ser dividida em três sub etapas principais (PHAN et al., 2003):

- (1) diluição do filme líquido existente entre a bolha e a partícula até uma espessura crítica ( $T_f$ );

- (2) ruptura do filme líquido e formação de um contato trifásico ( $T_r$ );
- (3) expansão da linha de contato trifásico para formar um agregado estável ( $T_{TPC}$ ).

A soma dos tempos correspondentes destas sub etapas corresponde ao tempo de união ( $T_{at}$ ), comumente chamado de tempo de indução e para que a união ocorra deve-se atender a Equação 2 (PHAN et al., 2003):

$$T_{contato} \geq T_{at} = (T_f + T_r + T_{TPC}) \quad (2)$$

De acordo com Wang et al. (2016) para aumentar o tempo de contato entre as bolhas e as partículas deve-se diminuir as forças de separação provenientes de fluxo turbulento, flotando as partículas em ambiente calmo e/ou aumentar as forças de união entre as partículas e as bolhas. A recuperação bem sucedida das partículas depende das forças capilares entre partículas e bolhas, ou seja, do nível hidrofóbico das partículas, que é refletida pelo ângulo de contato. Com maior hidrofobicidade, as partículas se juntam às bolhas com maior facilidade e, uma vez anexadas, uma ligação estreita se forma entre a partícula e a bolha.

Considera-se que os hidrofóbicos, Van der Walls e as forças eletrostáticas desempenham um papel significativo durante a fixação e na estabilidade do agregado de bolhas e partículas (LEGENDRE; SARROT; GUIRAUD, 2009).

De acordo com Ata e Jameson (2005) a estabilidade da partícula e da bolha para que possam flotar depende principalmente de três situações: (I) da massa máxima de uma partícula que pode permanecer ligada a uma bolha em um líquido em estabilidade, a qual depende do diâmetro das partículas, da tensão superficial, do ângulo de contato e da forma da partícula; (II) se a partícula pode permanecer unida à bolha, a segunda maior consideração é que deve haver uma força ascendente líquida no agregado partícula-bolha, isto é, a força de empuxo que atua sobre a bolha deve exceder a força de gravidade agindo sobre a partícula; (III) o terceiro requisito é que o agregado partícula-bolha é estável ao efeito da turbulência na célula de flotação.

A estabilidade do diâmetro da partícula dentro da coluna de flotação está diretamente relacionada à presença de surfactantes, devido à ação sobre a velocidade de ascensão das bolhas. Considerando uma bolha de 1 mm em água em condições normais, a velocidade ascendente é cerca de 25 cm/s para uma bolha limpa, enquanto que para uma bolha totalmente contaminada (presença de surfactantes) é de 11 cm/s (LEGENDRE; SARROT; GUIRAUD, 2009). Ou seja, as bolhas na presença de surfactantes permanecem mais tempo na coluna de flotação, aumentando o tempo de contato bolha-partícula e aumentando assim a probabilidade de flotação das partículas e eficiência do sistema.

Cho e Laskowski (2002) evidenciaram que o tamanho e a distribuição de tamanho das bolhas diminuem com o aumento na concentração de reagentes tensoativos e consequente diminuição da tensão superficial. Os autores concluíram que o efeito da adição destes reagentes permite controlar o tamanho das bolhas devido à concentração crítica de coalescência (CCC), ou seja, acima da CCC não ocorre coalescência porem em concentrações de tensoativo menores que a CCC a coalescência ocorre, sendo que cada tensoativo irá apresentar uma CCC diferente e específica.

#### *1.4.1.2 Características da superfície das bolhas e do líquido*

As propriedades de dispersão gás-líquido indicam como o gás é distribuído dentro de uma coluna de flotação e normalmente é caracterizado pela velocidade superficial do gás ( $J_g$ ), gás *hold up* ( $\varepsilon$ ), diâmetro da bolha ( $d_b$ ) e fluxo superficial da bolha ( $S_b$ ).

A velocidade superficial de gás é a medida da capacidade de aeração da coluna e é um parâmetro que permite a comparação entre colunas com diferentes diâmetros (Equação 3).

$$J_g = \frac{Q_{ar}}{A} \quad (3)$$

$Q_{ar}$ = Vazão de gás (cm<sup>3</sup>/s);

$A$  = Área transversal da coluna (cm<sup>2</sup>).

A velocidade superficial de ar ( $J_g$ ) crescente aumentará o tamanho de bolha ( $d_b$ ) na zona de coleta e na zona de espuma. Na zona de coleta a relação é aproximadamente:  $d_b \propto J_g^{0,25}$ . A partir de estudos em escalas piloto e industrial, definiu que a velocidade superior de gás é aproximadamente de 3,0 a 4,0 cm/s (FINCH, 1989 apud VIEIRA, 2005). Em um regime de fluxo de bolhas homogêneo, ocorre um aumento quase linear da velocidade superficial do gás (até 5 cm/s) tanto para sistema bifásico e trifásico (SHUKLA; KUNDU; MUKHERJEE, 2010).

O *hold up* do ar na coluna de flotação pode ser definido como sendo a fração volumétrica ocupada pelo ar na zona de coleta (ou da zona de espuma) em relação ao volume ocupado pela massa líquida, o gás e as partículas. Segundo Tavera; Escudero; Finch (2001) o *hold up* do gás é uma variável que afeta o desempenho da flotação e é uma função de um grupo amplo de variáveis presentes, tais como: variáveis químicas, tamanho de bolha em função do tipo de difusor, com o tipo de aerador, com a taxa de fluxo de ar e água, com as características e concentrações do espumante, com o conteúdo de sólido, dentre outras. Conforme Dobby; Yianatos; Finch (1988) o método da diferença de pressão (manômetro diferencial) é o mais simples para sistemas gás-líquido (Equação 4) (Figura 3):

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_f}{\rho_{sl}} \left( 1 - \frac{\Delta h}{L_2} \right) \quad (4)$$

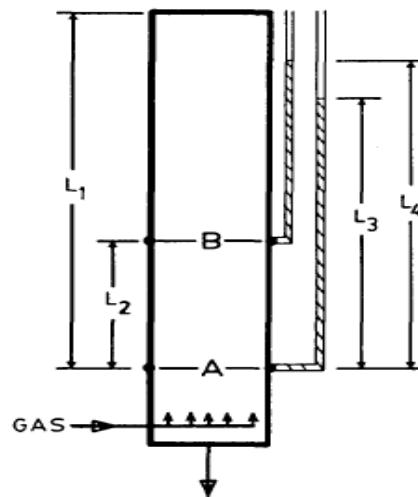
$\rho_f$  = Densidade da água ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );

$\rho_{sl}$  = Densidade entre os dois pontos de medição ( $\text{g}/\text{cm}^3$ );

$\Delta h$  = Diferença entre os níveis nos manômetros diferenciais ( $L_4-L_3$ ) (cm);

$L_2$  = Distância entre os pontos de manômetro (cm).

Figura 3 - Determinação de *hold up* por diferença de pressão em coluna de flotação.



Fonte: Dobby; Yianatos; Finch (1988).

O *hold up* do ar, em células de flotação, geralmente, está compreendido na faixa de 14-22 %, no entanto, podem apresentar valores de magnitudes tão baixas quanto 3 % e tão altas quanto 32 %, os autores atribuem a variação de valores dependente do tipo de célula, células com alta potência apresentam valores mais elevados (DEGLON; MENSAH; FRANZIDIS, 2000). Reis (2015) em uma coluna de flotação com presença de apatita encontrou o valor de 10-12 % no *hold up*, quando a velocidade do gás superficial está entre 1,2 e 2,4 cm/s, e a concentração de surfactante é superior a 30 ppm. Além disso para essa mesma faixa de velocidade superficial do gás corresponde a bolhas grandes e médias a baixas concentrações de surfactante.

A distribuição do tamanho das bolhas é uma das variáveis mais influentes na flotação, devido seu efeito na eficiência de colheita (eficiência de colisão, adesão e estabilidade do agregado partícula-bolha) e geralmente o diâmetro das bolhas é calculado a partir do diâmetro

médio de Sauter ( $d_{32}$ ). Que é definido como um diâmetro médio volume/superfície, dada na Equação 5:

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2} \quad (5)$$

$d_{bi}$ = diâmetro de bolhas (mm);

$n_i$ = número de bolhas.

Grau e Heiskenen (2005) mostraram que o tamanho médio de bolhas ( $d_{32}$ ) é afetado por fatores como fluxo de ar e concentração (dosagem) de espumante na célula de flotação. O fluxo de área superficial de bolhas ( $S_b$ ), quando se consideram bolhas esféricas e de tamanho uniforme, pode ser definido de acordo com a Equação (6).

$$S_b = \frac{6J_g}{d} \quad (6)$$

O fluxo da área de superfície da bolha foi relacionado ao desempenho da flotação e está relacionado com o *hold up* ( $S_b \pm 5.5\varepsilon$ ), esse fato é esperado devido à sua dependência semelhante à taxa de gás e ao tamanho da bolha (ambos aumentam à medida que a taxa de gás aumenta e o tamanho da bolha diminui) (FINCH et al., 2000).

As bolhas, depois de terem sido ligadas ou aprisionadas aos flocos, têm a velocidade de ascensão do complexo aumentada (CARISSIMI e RUBIO, 2005), sendo esta velocidade para cada complexo, individualmente relacionada ao seu tamanho, peso específico, massa (volume) de ar atacado, forma do agregado, temperatura da água e condições de fluxo (RODRIGUES e RUBIO, 2007). Na Tabela 1, são indicados valores comparativos entre bolhas de diferentes tamanhos em termos de quantidade, área superficial e velocidade de ascensão.

Tabela 1 - Comparação entre bolhas de diferentes tamanhos.

| <b>Tamanho da bolha (μm)</b>                             | <b>20</b> | <b>50</b> | <b>100</b> |
|--|-----------|-----------|------------|
| Número de bolhas (mL)                                    | 1.250.000 | 100.000   | 14.000     |
| Área superficial (cm <sup>2</sup> em 1 cm <sup>3</sup> ) | 23        | 12        | 6,6        |
| Velocidade de ascensão (m.h <sup>-1</sup> )              | 1         | 5         | 20         |

Fonte: Rodrigues e Rubio (2007).

De acordo com Assis (2006) uma menor velocidade ascensional proporciona um aumento do tempo de detenção das bolhas de ar no tanque de flotação e das chances de contato com os flocos. Se a velocidade ascensional for muito pequena, o tempo que a bolha demora pra flotar será desfavorável para a aplicação na colheita de biomassa.

#### 1.4.1.3 Ozônio flotação

A ozônio flotação agrega duas etapas de tratamento, quanto às propriedades físicas da flotação e quanto às propriedades de oxidação do ozônio que também age como um coagulante/floculante para a recuperação de microalgas, entretanto ainda são limitados esses estudos. Sendo mais utilizado o ozônio na oxidação e desinfecção no tratamento de águas residuais (LEE et al., 2008).

Em uma solução aquosa, o ozônio se dissocia mais rápido do que no ar e se quebra muito rapidamente em soluções alcalinas e permanece bastante estável nos ácidos (ROSHCHINA e ROSHCHINA, 2003). De acordo com Metcalf e Eddy (1991) o ozônio é capaz de reagir com uma numerosa classe de compostos orgânicos, devido, principalmente, ao seu elevado potencial de oxidação ( $E^0 = 2,08 \text{ V}$ ). Os mecanismos de ação ocorrem por dois tipos de reações: reações diretas, as quais envolvem o ozônio molecular, e reações indiretas, que envolvem reações com os radicais hidroxila (LAPOLLI et al., 2003). Algumas das propriedades químicas apresentadas pelo ozônio podem ser descritas por suas reações de decomposição (Equação 7, 8, 9 e 10):



Várias substâncias podem atuar como agente iniciador da decomposição do ozônio em solução aquosa. Os radicais livres formados, íons hidroperóxidos ( $\text{HO}_2$ ) e íons hidroxila ( $\text{OH}$ ), têm grande poder oxidante e isso gera a oxidação de outras impurezas em soluções aquosas, além de desintegrar as células (lise celular) de microorganismos (METCALF e EDDY, 1991).

De acordo com Hoigne e Bader (1983), as reações de oxidação iniciadas pelo ozônio na água apenas parte do ozônio reage diretamente com substâncias dissolvidas e outra parte pode se decompor antes da reação. As reações do ozônio com compostos orgânicos não dissociados na água podem prosseguir das seguintes formas (Equação 11, 12, 13 e 14):

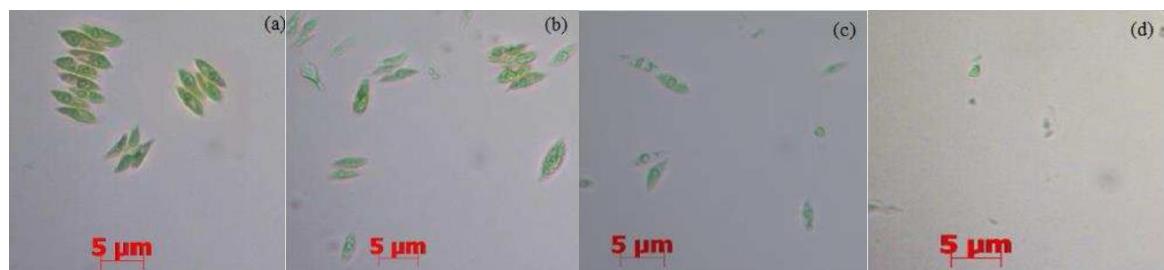


(11) Reação direta do ozônio com a substância dissolvida (M), um composto orgânico não dissociado, que irá formar uma substância oxidada (Mox); (12) Radical tipo de reação em que o ozônio reage com íons  $\text{OH}^-$  para formar um radical de  $\text{OH}^{\cdot}$ , o qual, por sua vez, reage com moléculas de substância orgânica (M) para produzir radicais (R); (13 e 14) Toda essa cadeia está quebrada em novos produtos estáveis (P).

Em sistemas de tratamento que são utilizados ozônio flotação muitos parâmetros influenciam diretamente na transferência de ozônio na massa líquida. Lapolli et al. (2003) destacam como principais parâmetros a turbulência entre as fases gasosa e líquida, o número e tamanho das bolhas e a área de transferência interfacial entre as duas fases dos fluidos.

Na Figura 4 são apresentadas fotomicrografias de *Scenedesmus obliquus* sob a oxidação do ozônio obtidas por Reis (2014), de acordo com o autor antes do processo de ozonização, observa-se uma elevada presença de cenóbios (4a), após 20 min da ozonização (4b) ocorre um desarranjo das microalgas e depois (4c) não possui cenóbios visíveis de 4 e 8 células, além de um processo de despigmentação das microalgas e ao final (4d) não se observam células com a cor característica esverdeada.

Figura 4 - Aspecto das células da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003. (a) antes da ozonização; (b) após 10 min; (c) 20 min e (d) 50 min após a ozonização.



Fonte: REIS (2014).

A ação do ozônio nas microalgas provoca o rompimento da parede celular, consequentemente a liberação da matéria orgânica extracelular (MOE) e da matéria orgânica intracelular (MOI), ocorrendo assim a oxidação de seus compostos (MA et al., 2006; NGUYEN et al., 2013). Devido à essa oxidação, ocorre a despigmentação das células (Figura 4), além da redução do potencial zeta, favorecendo assim a aglomeração e posterior flotação das microalgas.

Cheng, Ya et al. (2011) observaram a redução da carga superficial das células de *Scenedesmus obliquus*, devido à ação de bolhas de ozônio quando aplicado uma concentração

de ozônio de 0,2 a 0,5 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa e associam isso justamente a liberação de matéria orgânica algogênica (MOA). O mesmo aconteceu quando foi utilizada a espécie *Chlorella vulgaris* porém com uma concentração de ozônio inferior a 0,005 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa (CHENG et al., 2010).

Betzer; Argaman; Kott (1980) observaram pela primeira vez a separação de microalgas com flotação por ozônio induzido, a partir de efluentes de lagoas de oxidação. Foram aplicadas concentrações de ozônio de 15 a 50 mg/L, o qual obtiveram uma completa separação das microalgas sem a adição de coagulantes, não deixando resíduos na água.

Komolafe et al. (2014) avaliaram a recuperação de biomassa e de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) por ozônio flotação. Os autores obtiveram sucesso com o cultivo de *Desmodesmus sp.* e pela cultura mista nativa (*Oscillatoria* e *Arthrospira*) em água residual, obtendo uma redução significativa nos nutrientes das águas residuais e coliformes totais. Além disso, o FAME obtido a partir da ozônio flotação apresentou maior estabilidade oxidativa, portanto, o ozônio pode ser usado como um método combinado de colheita e redução da insaturação FAME. O trabalho de Velasquez-Orta et al. (2014) também avaliaram a recuperação de biomassa, lipídeos e FAME por ozônio flotação, no qual obtiveram uma porcentagem elevada de biomassa colhida (79,6 %) ao usar uma concentração de ozônio de 0,23 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa seca, e perceberam que a quantidade de lipídeos extraídos e FAME recuperados da biomassa duplicaram quando comparados a centrifugação.

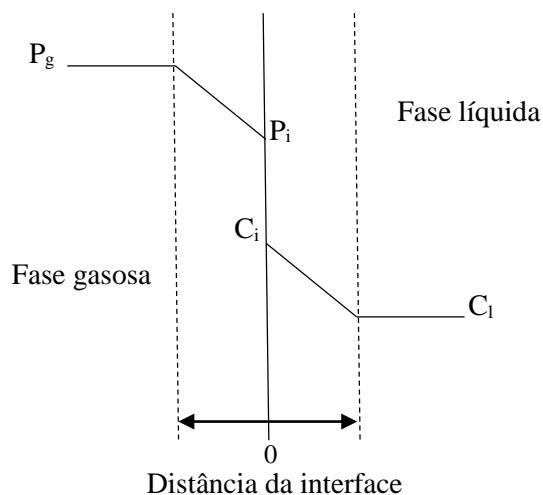
González et al. (2016) avaliaram o efeito da ozônio flotação na excreção de proteínas, extração de lipídeos e recuperação de biomassa. Comprovando que a liberação de proteínas de microalgas apresenta efeitos surfactantes, diminuindo a tensão superficial do sistema (42 mN/m) e promovendo assim a formação de espuma e recuperação de biomassa. Sendo necessário uma concentração crítica de micelas (CMC) de pelo menos  $550 \pm 17$  mg de proteína/L, a qual está relacionada a concentração de proteína necessária para reduzir a tensão superficial, bem como a concentração de ozônio necessária para a separação de microalgas.

#### 1.4.1.4 Transferência de massa de ozônio

A transferência de massa de ozônio da fase gasosa para a fase líquida baseia-se em processos heterogêneos, e é de fundamental importância para avaliar a eficiência do sistema de ozonização aplicado no tratamento de água, esgoto e colheita de biomassa. Existem diversas teorias que explicam o processo de transferência de massa gás-líquido, com a hipótese da existência de filmes estacionários na superfície do líquido quando em contato com um gás.

O modelo de Lewis e Whitman (1924) propõe para a interface gás-líquido a existência de um filme gasoso e de um filme líquido, a qual ocorre uma resistência a passagem de moléculas de gás entre a massa do líquido e a massa gasosa, conhecida como a teoria dos Dois Filmes (Figura 5). Leva-se em consideração que um sistema gás-líquido que não está em equilíbrio tende a se aproximar das condições de equilíbrio, o que ocasiona o transporte do gás (sóluto) por difusão molecular.

Figura 5– Diagrama esquemático do modelo de transferência de gás “teoria dos dois filmes”.



Fonte: Adaptado de Schroeder (1977).

Na transferência de massa cada camada (gás e líquido) tem sua resistência. As condições na interface são determinadas pelo equilíbrio entre as concentrações de gás e líquido, entre a pressão parcial e a concentração (Equação 15).

$$P_i = f(C_i) \quad (15)$$

$P_i$ = Pressão parcial na interface em equilíbrio;

$C_i$ = Concentração do gás.

Admitindo as considerações sobre o fluxo de massa através da fase gasosa e líquida, como o produto de um coeficiente de transferência do corpo líquido e gasoso, obtém-se a seguinte Equação 16:

$$J = \frac{1}{A} \frac{dC}{dT} = K_g (P_g - P_i) = K_l (C_i - C_l) \quad (16)$$

$J$  = Fluxo de massa ( $\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ );

$A$  = área de contato ( $\text{m}^{-1}$ );

$\frac{dC}{dT}$  = Variação da concentração no tempo;

$K_g$  = Coeficiente de transferência de massa no filme gasoso ( $\text{kmol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ );

$P_g$  = Pressão parcial do gás no vapor (atm);

$P_i$  = Pressão parcial do gás na interface (atm);

$K_l$  = Coeficiente de transferência de massa no filme líquido ( $\text{m}/\text{s}^{-1}$ );

$C_i$  = Concentração do gás na interface ( $\text{kg}/\text{m}^3$ );

$C_l$  = Concentração do gás no líquido ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ).

Como os filmes são considerados muito finos, entende-se que todo o gás que passa através de um filme é o mesmo que passa pelo outro, sendo considerado que a taxa de transferência de gás através do filme gasoso deve ser igual à taxa de transferência através do filme líquido. Sendo assim, o equilíbrio termodinâmico é alcançado na interface gás-líquido entre a pressão e a concentração do gás, logo se aplica a lei de Henry (Equações 17 e 18):

$$P_g = H * C^* \quad (17)$$

$$P_i = H * C_i \quad (18)$$

$H$  = Constante da lei de Henry;

$C^*$  = Concentração do gás dissolvido no líquido em equilíbrio com a  $P_g$ .

Substituindo as Equações 17 e 18, na Equação 16 e considerando a igualdade (Equação 19):

$$J = \frac{1}{A} \frac{dC}{dT} = K_g H (C^* - C_i) = K_l (C_i - C_l) \quad (19)$$

Logo a concentração na interface (Equação 20):

$$C_i = \frac{K_g H C^* + K_l C_l}{K_l + K_g H} \quad (20)$$

Utilizando-se o valor de  $C_i$  da equação (20) na equação (19), obtém-se a correlação dos coeficientes de transferência individuais ( $K_g$  e  $K_l$ ) com o coeficiente de transferência global ( $K_L$ ) referente à fase líquida e à fase gasosa (Equação 21 e 22):

$$K_l = \frac{1}{\frac{1}{H K_g} + \frac{1}{K_L}} \quad (21)$$

$$K_g = \frac{1}{\frac{1}{K_g} + \frac{H}{K_L}} \quad (22)$$

De acordo com a teoria para gases que apresentam baixa solubilidade, como o ozônio que é um gás pouco solúvel e toda a resistência a transferência de massa é localizada no filme líquido. Isso significa que praticamente toda a resistência à transferência de massa da fase

gasosa para a fase líquida se deve ao filme estacionário líquido e não ao gasoso. O mesmo foi verificado por Flores-Payán et al. (2015) em que a variável de transferência  $k_{La}$  teve o maior efeito na fase líquida e menor no processo de transferência de massa em fase gasosa. Assim, é dada a velocidade de transferência de massa (Equação 23):

$$\frac{dC}{dT} = K_L a(C^* - C_L) \quad (23)$$

$a$  = Área por unidade de volume do reator ( $m^{-1}$ );

$K_L$  = Coeficiente de transferência de massa global na fase líquida ( $m/s^1$ );

$T$  = Tempo (s);

$K_L a$  = Coeficiente volumétrico global de transferência de massa ( $s^{-1}$ );

$C^*$  = Concentração de saturação de ozônio na fase líquida ( $kg/m^3$ );

$C_L$  = Concentração de ozônio na fase líquida ( $kg/m^3$ ).

Muitos fatores influenciam a transferência de ozônio da fase gasosa para a fase líquida como a concentração do ozônio, a vazão de ozônio, tamanho e a velocidade das bolhas, a geometria da câmara de contato, o dispersor utilizado, além das características físicas e químicas do meio.

Mahyar et al. (2017) avaliou de forma experimental a taxa de transferência de massa de ozônio em um reator de fluxo descendente e forneceu modelos empíricos para prever o coeficiente de transferência de massa na fase líquida ( $K_L$ ) em processos contínuos e semi-contínuos. De acordo com os autores houve um aumento no  $K_L$  quando se aumenta a velocidade superficial do gás  $U_G$  e o número de Reynolds ( $60 \leq Re_L \leq 240$ ) nos processos contínuo e semi-contínuo. Porém o  $K_L$  teve influências diferentes quanto ao tipo de processo, no processo semi-contínuo o  $U_G$  teve maior influência, já no contínuo, o número de  $Re_L$  governou a taxa de transferência de massa do ozônio. Os modelos empíricos desenvolvidos para prever o  $K_L$  como função de  $Re_L$ ,  $U_G$  e tipo de processo, apresentou uma boa correlação ( $R^2 > 0,99$ ) dos valores calculados pelo modelo com os valores experimentais.

Al-Abduly et al. (2014) verificaram que um reator de fluxo oscilatório (OBR) foi 3 e 5 vezes mais eficiente para a transferência de massa de ozônio volumétrico ( $K_{La}$ ) do que os reatores de coluna de bolhas e de coluna compartimentada, respectivamente. No entanto, verificou-se que a eficiência de transferência de massa (MTE) em ambos os reatores aumenta proporcionalmente com a taxa de fluxo de água e inversamente para as taxas de fluxo de gás, devido à diminuição do tempo de contato entre as fases e à aceleração das colisões de bolhas. Os resultados mais significativos do  $K_{La}$  e do MTE foram alcançados usando OBR sob pressão atmosférica, com um curto comprimento do reator, e baixas proporções volumétricas de

gás/líquido tornam este tipo de reator um dos mais eficazes contatores para transferência de massa de ozônio-água.

Mitani et al. (2005) determinando o  $K_{La}$ , variando a vazão de gás e do líquido, bem como microdifusores, perceberam que utilizando difusores microporosos, a vazão do líquido é mais importante que a do gás no processo de transferência de massa, contrário para difusores convencionais, e afirmam que o tamanho das bolhas e o grau de coalescência são cruciais para determinar a taxa de transferência de massa.

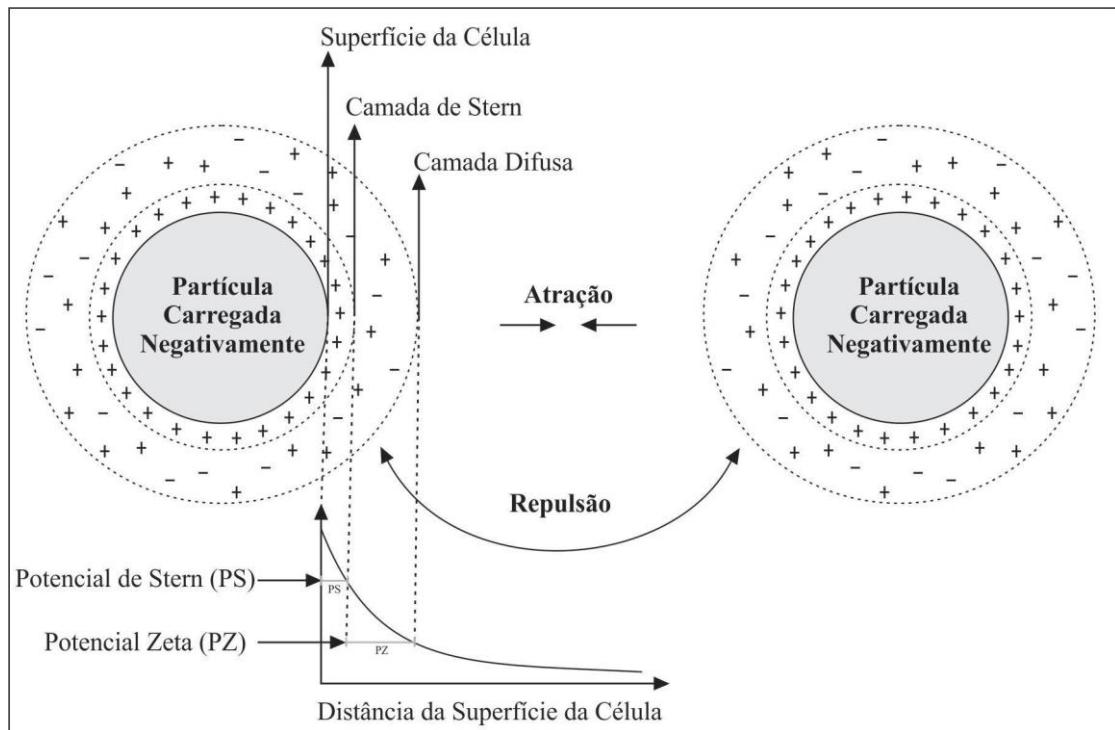
#### **1.4.2 Coagulação/flocação**

Os métodos de colheita de microalgas geralmente utilizam duas etapas de tratamento, a primeira visa favorecer à agregação das células como a coagulação/flocação para serem removidas em etapas posteriores. Devido principalmente ao pequeno tamanho das células de microalgas a coagulação/flocação química é frequentemente realizada para aumentar o tamanho dessas partículas. Além de ser uma das operações mais viáveis energeticamente na separação de microalgas, comparado a outros.

A etapa de coagulação é aplicada para desestabilizar as partículas dispersas no meio líquido, reduzindo ou neutralizando sua carga de repulsão com a aplicação de coagulantes químicos, geralmente sais de ferro e alumínio, e a flocação é o resultado da agregação das partículas entre si, aumentando seu tamanho efetivo (flocos), facilitando etapas posteriores de remoção. No caso da remoção de microalgas as células são carregadas negativamente, o que impede a agregação natural. Portanto na coagulação as cargas superficiais das células podem então ser neutralizadas com a aplicação de coagulantes e/ou floculantes.

A carga negativa na superfície das células atrai íons positivos (cátions) do líquido, formando uma camada de íons positivos e negativos, denominado camada de Stern ou camada compacta. Essa força de repulsão que mantém as partículas separadas, ocorre devido à grandeza da carga superficial das partículas coloidais (potencial zeta). Enquanto a força de atração entre as partículas ou de partículas com íons de carga oposta, que tendem a se aproximar de sua superfície formam a camada de Stern decorrente da força de atração de Van der Waals (LIBÂNIO, 2010). Porem essas forças de atração são insuficientes para superar a repulsão eletrostática (Figura 6).

Figura 6 – Estrutura da dupla camada elétrica de íons e a força líquida entre células de microalgas de carga similar.



Fonte: Adaptado de Vandamme; Foubert; Muylaert (2013).

Quando a força iônica da solução é alta, a camada difusa, a camada em que existe um gradiente de concentração de íons, ocorre um aumento na magnitude do potencial zeta que representa o aumento nas forças eletrostáticas repulsivas (SCHROEDER, 1977). Logo, para obter a aglomeração das partículas o potencial zeta deve ser nulo, ou seja, as forças atraentes de van der Waals superam as forças repulsivas eletrostáticas.

Para neutralizar as forças repulsivas (cargas superficiais) das microalgas, diversos são os coagulantes/floculantes utilizados. Um grande número de produtos químicos foram testados, incluindo vários sais minerais inorgânicos de metal (DUAN e GREGORY, 2003), os coagulantes inorgânicos mais comumente utilizados são geralmente sulfato de alumínio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ), sulfato férrico ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) e o cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) (GRIMA et al., 2003), e também são utilizados com menor frequência os polímeros/polieletrólitos orgânicos (CHENG, YU et al., 2011).

A coagulação/flocação é um processo complexo e vários parâmetros podem afetar a sua eficiência, incluindo: propriedades da superfície celular (área superficial, morfologia, idade, carga superficial e matéria orgânica algogênica), número de células por unidade de volume, pH da água e o tipo e concentração de coagulante (ELDRIDGE; HILL; GLADMAN, 2012).

Porém nem todos os coagulantes/floculantes são indicados devido à contaminação da biomassa, a qual é uma questão importante porque os produtos químicos podem limitar o uso da biomassa (por exemplo, alimentos ou alimentos para animais) ou interferir no processamento da biomassa (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

De acordo com Bratby (2016) durante a fase logarítmica do crescimento das algas, a carga superficial negativa das células é relativamente alta e as células de algas permanecem estáveis e dispersas, porém à medida que a taxa de crescimento se reduz (fase estacionaria-declínio), a carga superficial negativa diminui e as células começam a se aglomerar e se assentar, resultando em um processo chamado autoflocação. Isto é reforçado pela excreção natural de matéria orgânica algogênica extracelular (MOE) que se assemelha a polímeros orgânicos.

De modo geral, a adição de coagulantes/floculantes é necessária para a formação dos flocos e remoção da biomassa, entretanto vale ressaltar que adotando a fase estacionaria do cultivo se reduz a aplicação de coagulantes, consequentemente reduz também custos e problemas de contaminação.

Durante a flocação, as células individuais formam agregados maiores (flocos) que podem ser separados do meio por simples sedimentação por gravidade. A flocação é utilizada para concentrar uma suspensão diluída de 0,5 g/L de matéria seca de 20-100 vezes para uma massa de 10-50 g/L (VANDAMME; FOUBERT; MUYLAERT, 2013).

A colheita de biomassa requer uma ou mais etapas de separação sólido-líquido, a coagulação/flocação é essencialmente um passo de pré-tratamento para melhorar a colheita celular por métodos como sedimentação por gravidade, filtração, centrifugação e flotação (GRIMA et al., 2003).

Borges (2014) na coagulação/flocação seguido de flotação por ar dissolvido utilizando o  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  para colheita de biomassa de *Nannochloropsis oculata* obteve baixas remoções (menor que 60 %) com concentrações de 40 a 160 mg  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ /g de microalga. O autor relata a desvantagem da aplicação de coagulante químico devido ao problema de contaminação da biomassa com sais de alumínio ou ferro.

Reyes e Labra (2016) utilizando *Scenedesmus* sp. obtiveram uma eficiência de remoção de 98% com uma concentração de 1,5 g/L de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . Com a mesma espécie, Chen et al. (2013) obtiveram uma remoção de 98% após 10 minutos de decantação com 0,3 g/L de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ .

### 1.4.3 Tamanho de bolhas por análise de imagem

A utilização de técnicas precisas para determinar o tamanho das bolhas é de fundamental importância para compreender as interações físicas relacionadas à eficiência do sistema em coluna de flotação.

Diversas são as técnicas utilizadas em sistemas bifásicos (gás-líquido) e trifásicos (gás-líquido-sólido) para determinar de forma precisa a distribuição do diâmetro de bolhas, sendo a maior parte baseada na técnica de análise de imagens digitais (COWARD; LEE; CALDWELL, 2015; ENGLERT, 2008; LIN et al., 2008; MALDONADO et al., 2015; MORUZZI, 2005; REIS e BARROZO, 2016; VAZIRIZADEH; BOUCHARD; CHEN, 2016; RODRIGUES, 2004; RODRIGUES e RUBIO, 2003; SOARES, 2007). Os métodos fotográficos em combinação com o processamento de imagens digitais, aparentemente, é uma solução promissora para obter medidas confiáveis de tamanho de bolha em sistemas trifásicos (GRAU e HEISKANEN, 2002).

Alguns fenômenos, como transferência de massa, adsorção, difusão e reações bioquímicas são influenciadas diretamente pelo tamanho das bolhas. Bolhas grandes tendem a flotar mais rápido por ter uma maior velocidade ascensional dificultando a eficiência desses fenômenos, aumentando esse problema quando se utiliza bolhas de ozônio, onde o tempo de contato entre a bolha e a partícula não deve ser muito pequeno para que possam ocorrer as reações, e nem muito grande impossibilitando sua aplicação. Moruzzi (2005) destaca que as alterações da velocidade ascensional do conjunto bolha-partícula podem implicar no rompimento da ligação bolha/floco se o ângulo de contato não possuir valor suficiente para resistir ao aumento das tensões cisalhantes (viscosidade do líquido) devido ao aumento do empuxo atuante e em uma situação extrema pode haver um número menor de bolhas que o mínimo necessário para que a flotação ocorra.

O tamanho das bolhas é influenciado pela presença de diversas partículas e de agentes adicionados para modificar a superfície das partículas. Em uma coluna de flotação com adição de tensoativo as maiores frequências de bolhas obtidas estiveram na faixa de 0 a 300  $\mu\text{m}$ , enquanto que, no sistema sem adição de tensoativos existe uma ampla faixa de tamanho presente no sistema (600 e 1000  $\mu\text{m}$ ). Além de se observar que as bolhas na presença de minérios são menores do que bolhas presente no sistema bifásico (ar-água) (REIS, 2015).

Coward; Lee; Caldwell (2015) descreveram que o mecanismo de formação de bolhas em função do tamanho da bolha e da velocidade de elevação é um recurso chave que afeta significativamente a eficiência da colheita de microalgas. Os autores perceberam que os diâmetros do poro dos difusores interferem significativamente no tamanho das bolhas, as

menores bolhas ( $622 \mu\text{m}$  diâmetro de Sauter) proporcionou uma velocidade de ascensão de  $0,012 \text{ m/s}$  e foram obtidas com um difusor cerâmico com  $35 \mu\text{m}$  de diâmetro de poro proporcionou os maiores níveis de recuperação de biomassa devido ao aumento nas colisões de algas e na estabilidade bolha-algas.

Hanotu; Bandulasena; Zimmerman (2012) na microflotação a caracterização das bolhas mostraram que o tamanho médio da bolha gerado no estado de fluxo de ar oscilatório era de  $86 \text{ mm}$ , aproximadamente o dobro do tamanho do poro do difusor de  $38 \text{ mm}$ . Em contraste, o fluxo de ar contínuo na mesma taxa através dos mesmos difusores produziu um tamanho médio de bolha de  $1,059 \text{ mm}$ , 28 vezes maior do que o tamanho dos poros. Os autores atribuem isso ao pulso gerado, devido à oscilação ajudar a reduzir bolhas no estágio de desenvolvimento. Em contraste, as bolhas continuam a crescer sob fluxo contínuo até um ponto em que sua força flotante é forte o suficiente para superar as forças de tensão superficial. Sob este estado de baixa pressão, a diferença de força é a chave para o desprendimento de bolhas da fonte e geralmente, as bolhas são várias ordens de grandeza maiores do que o seu poro de saída. Da mesma forma, devido à coalescência entre bolhas vizinhas, as bolhas crescem pelo menos uma ordem de grandeza maior do que o poro de saída sob condição de fluxo de ar constante.

A frágil estrutura das microbolhas de ozônio presentes nas colunas de flotação e a possibilidade de aglutinação e dissolução das mesmas constituem as principais causas da deformação dos resultados quando métodos intrusivos ou que utilizam extração de amostras (*off-line*) são aplicados. Porem no trabalho de Reis (2015) as mesmas tendências foram obtidas para os resultados do método *off-line* e *online*, e observou que o aumento na vazão de ar aumenta o tamanho das bolhas.

#### **1.4.4 Tratamento de água residual mediante o uso de microalgas**

##### *1.4.4.1 Águas residuais e seu uso para o cultivo de microalga*

As atividades antropogênicas têm ocasionado um grande impacto com o aumento no descarte de águas residuais cada vez mais intensas. O maior problema do descarte é a falta de tratamento, no Brasil se trata apenas 42,7% dos esgotos gerados (BRASIL, 2015), logo a outra parcela é descartada sem tratamento pelo escoamento direto ou por infiltração até atingir os cursos d'água ou aquíferos.

O principal problema do descarte sem tratamento das águas residuais é o elevado conteúdo de matéria orgânica e a alta concentração de nutrientes, principalmente N e P, bem

como metais tóxicos, ocasionando problemas de contaminação e eutrofização, tendo como consequências a redução da biodiversidade, aumento da toxicidade da água e da turbidez, redução de oxigênio dissolvido na água, entre muitos outros.

Algumas espécies de microalgas são particularmente tolerantes às condições de efluentes de esgoto e muitos pesquisadores relatam sua viabilidade e eficiência na remoção de N, P e metais tóxicos de águas residuais (AHLUWALIA e GOYAL, 2007; GUDE, 2016; GUPTA, 2016; HE et al., 2017; LABBÉ et al., 2017), além de propiciar o sequestro de CO<sub>2</sub> atmosférico (ELOKA-EBOKA e INAMBAO, 2017; TRIPATHI; SINGH; THAKUR, 2015; ZHU et al., 2017).

Um dos gêneros tolerantes aos esgotos é a *Scenedesmus*, sendo que várias espécies desse gênero podem fornecer uma remoção elevada de nutrientes (> 80%) e, em muitos casos, quase completa N e P total de águas residuais (RUIZ-MARIN et al. 2010; KIM et al., 2015; LEKSHMI et al., 2015; SHEN et al., 2015).

A capacidade das microalgas para crescer eficazmente em ambientes ricos em nutrientes e para acumular eficientemente nutrientes e metais das águas residuais, torná-los um meio extremamente atraente para o tratamento de águas residuais sustentáveis e de baixo custo (DE-BASHAN e BASHAN, 2010).

Gupta et al. (2016) encontrou excelentes resultados de remoção utilizando a *Chlorella sorokiniana* e a *Scenedesmus obliquus* no tratamento de águas residuais sem adicionar qualquer outro tratamento. *S. obliquus* apresentou um maior potencial de remoção quando comparada a *C. sorokiniana*, com 76,13 % de carbono orgânico, 98,54 % de N, 97,99 % de P e remoção de 99,93 % de coliformes totais e completa remoção de coliformes fecais. Uma vantagem apresentada com o aumento nos níveis de estresse (Fv/Fm de 0,48 ± 0,03) foi o aumento da acumulação de lipídeos nas células (23,26 ± 3,95% p/p). Um importante composto para a produção de biocombustíveis.

Ruiz-Marin et al. (2010) comparou o crescimento de *Scenedesmus obliquus* em condições semi-contínua para a remoção de N e P e descobriu que o crescimento inicial ao longo de quatro ciclos de cultivo (181 h) foi muito maior do que na cultura em lotes, possivelmente devido à redução de nutrientes no lote, mas após quatro ciclos de cultura, o crescimento e teor de clorofila e proteínas das células diminuíram significativamente, indicando um colapso da cultura.

Por um lado o uso das águas residuais pode ser um meio viável para aumentar a sustentabilidade da produção de biocombustíveis, já que o maior problema enfrentado pela geração de biocombustível a partir de biomassa microalgal é principalmente a necessidade de

construções de instalações para cultivo, nutrientes para crescimento, colheita e processamento da biomassa.

A falta de sistemas eficientes de remoção de algas é a principal razão pela qual o tratamento de águas residuais com base em algas não é amplamente utilizado pela indústria de águas residuais e é um impedimento significativo para a colheita de biomassa de tanques de algas de alta taxa (DE-BASHAN e BASHAN, 2010).

#### *1.4.4.2 Composição bioquímica das microalgas*

As microalgas são organismos fotossintéticos unicelulares ou multicelulares que estão presentes em diversos habitats, tais como ambientes de água marinha, doce, salobra e residuais, com diferentes condições de temperatura, pH, oxigênio, disponibilidade de nutrientes e outros.

São constituídas basicamente de proteínas, lipídeos e carboidratos (Tabela 2) e encontrase em diferentes formas, geralmente são pequenas com diâmetro de 3 a 30 µm (DERMIBAS, A. e DERMIBAS, M. F., 2010).

Tabela 2 - Composições bioquímicas de microalgas em matéria seca (%).

| <b>Microalgas</b>                 | <b>Proteínas</b> | <b>Carboidratos</b> | <b>Lipídeos</b> |
|-----------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| <i>Scenedesmus obliquus</i>       | 50–56            | 10–17               | 12–14           |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i>    | 47               | -                   | 1.9             |
| <i>Scenedesmus dimorphus</i>      | 8–18             | 21–52               | 16–40           |
| <i>Chlamydomonas rheinhardtii</i> | 48               | 17                  | 21              |
| <i>Chlorella vulgaris</i>         | 51–58            | 12–17               | 14–22           |
| <i>Chlorella pyrenoidosa</i>      | 57               | 26                  | 2               |
| <i>Spirogyra sp.</i>              | 6–20             | 33–64               | 11–21           |
| <i>Dunaliella bioculata</i>       | 49               | 4                   | 8               |
| <i>Dunaliella salina</i>          | 57               | 32                  | 6               |
| <i>Euglena gracilis</i>           | 39–61            | 14–18               | 14–20           |
| <i>Prymnesium parvum</i>          | 28–45            | 25–33               | 22–38           |
| <i>Tetraselmis maculata</i>       | 52               | 15                  | 3               |
| <i>Porphyridium cruentum</i>      | 28–39            | 40–57               | 9–14            |
| <i>Spirulina platensis</i>        | 46–63            | 8–14                | 4–9             |
| <i>Spirulina maxima</i>           | 60–71            | 13–16               | 6–7             |
| <i>Synechococcus sp.</i>          | 63               | 15                  | 11              |
| <i>Anabaena cylindrica</i>        | 43–56            | 25–30               | 4–7             |

Fonte: Dermibas, A. e Dermibas, M. F. (2010).

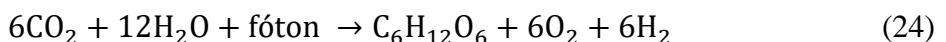
As proteínas nas microalgas têm funções estruturais e metabólicas, são utilizadas como catalisadores do metabolismo celular por facilitar o crescimento (WILLIAMS e LAURENS, 2010). Cheng, Ya et al. (2011) sugeriram que as proteínas liberadas pela lise celular modificam a hidrofobicidade das superfícies das bolhas, atuando como surfactantes. E foram comprovadas por González et al. (2016) que as proteínas exibem atividade surfactante na água interrompendo sua tensão superficial.

Os lipídeos compreendem uma fração de biomassa que representa os triglicerídeos formados como armazenamento de energia para microalgas (SUALI e SARBATLY, 2012). E se dividem em lipídeos polares que incluem glicolipídios e fosfolipídios nas membranas estruturais sob a forma de corpos de reserva de energia e os lipídeos neutros são tipicamente os constituintes do tipo triglicerídeos, diglicerídeos e monoglicerídeos (GREENWELL et al. 2010).

Algumas espécies de microalgas tem uma maior capacidade de produzir lipídeos, e a sua extração é um processo que influencia no rendimento de biocombustível e vantagem financeira de operação. De acordo com Hu et al. (2008) manter as microalgas em condições de estresse (mudança de pH, temperaturas extremas, limitação de nutrientes), aumenta a produção de lipídeos (HU et al., 2008).

As estruturas das células das microalgas dificultam a extração dos lipídeos, o que limita a aplicação de alguns processos. Neste caso, a aplicação de ozônio é uma tecnologia de colheita que ajuda a aumentar a disponibilidade de lipídeos (NGUYEN et al., 2013).

Os carboidratos são produtos gerados pela fotossíntese durante a fixação do CO<sub>2</sub> captado do ar (CHEN et al., 2013). A energia capturada pela fotossíntese das microalgas é usada para separar moléculas de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, produz carboidratos através do ciclo de Calvin com um processo geral que pode ser resumido pela Equação 24:



Um mínimo de 8 fótons deve ser absorvido para dividir uma molécula de CO<sub>2</sub> e duas moléculas de H<sub>2</sub>O para produzir uma molécula de carboidrato (CH<sub>2</sub>O), uma molécula de O<sub>2</sub> e uma de H<sub>2</sub>O (VASUDEVAN e BRIGGS, 2008).

As rotas metabólicas para a síntese de biomoléculas com alto valor energético (carboidratos e lipídeos) estão estreitamente relacionadas. Para aumentar a viabilidade econômica da produção de biocombustível (biodiesel/bioetanol) é necessário que as microalgas atinjam a maior produtividade do conteúdo de lipídeos/carboidratos (HO; CHEN; CHANG, 2012), porém esse processo nem sempre é viável. O elevado teor de lipídeos/carboidratos geralmente ocorre sob estresse ambiental (deficiência de nutrientes), o que acarreta uma baixa

produtividade de biomassa, e portanto, baixa produtividade de lipídeos/carboidratos (DRAGONE et al., 2011), sendo necessário combinar os parâmetros envolvidos para uma melhor produtividade.

#### **1.4.5 Microalgas como fonte de biocombustível**

O interesse pela produção sustentável de energia é um dos recursos mais importantes no desenvolvimento de tecnologias, e uma das fontes promissoras é o uso de microalgas como matéria prima. Essas são obtidas na natureza, não necessitam de boas condições para se desenvolver, ocupam uma pequena área para crescimento e substituem o uso de produtos alimentícios para a produção de biocombustível.

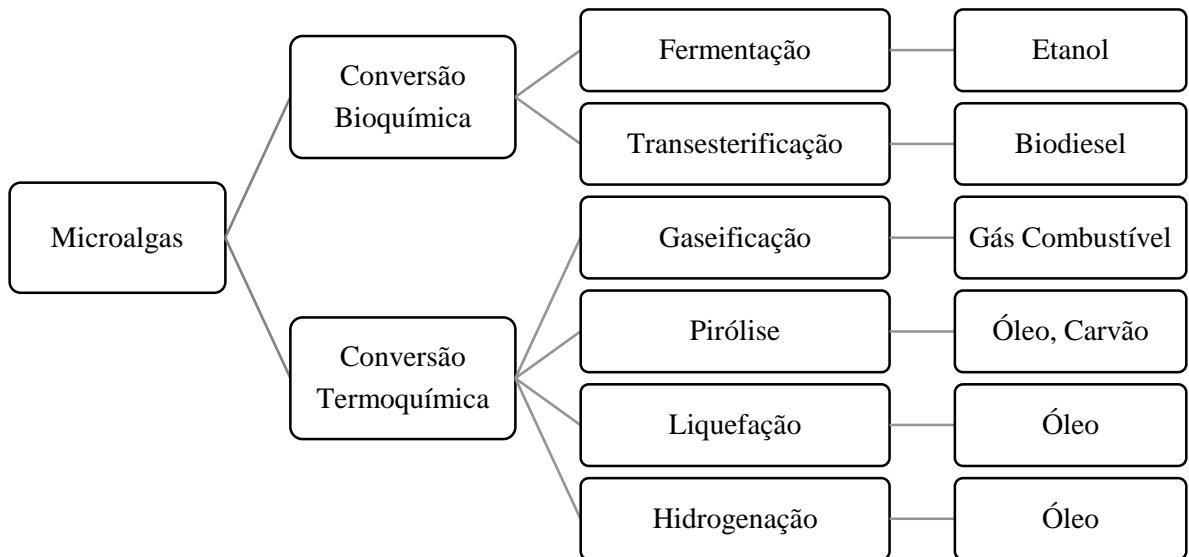
De acordo com Greenwell et al. (2010) obter uma espécie de alga que tenha uma alta taxa de crescimento, alto teor de lipídeos e facilidade de colheita e extração é um dos grandes desafios biológicos para a pesquisa de biocombustível.

As principais vantagens potenciais em comparação com culturas de plantas convencionais são principalmente: I) a maior produtividade de biomassa por unidade de área e tempo (MOHEIMANI e BOROWITZKA, 2006); II) não competitividade de terra, para produção de alimentos e fibras, uma vez que pode ser produzido mesmo em terras não-aráveis (SINGH et al., 2011); III) melhor economia da água e dos nutrientes através de uma reciclagem eficaz (ZHOU et al., 2013); IV) possibilidade de utilização de resíduos de indústrias como fonte de nutrientes baratos, especialmente CO<sub>2</sub>, N e P, que possam auxiliar na gestão de resíduos urbanos ou industriais, ajudar a mitigar as alterações climáticas e a reduzir a procura por fertilizantes (ZHOU et al., 2013).

As microalgas contêm lipídeos e ácidos gordurosos como componentes da membrana, produtos de armazenamento, metabólitos e fontes de energia, e muitas podem ser induzidas a acumular de 2 a 40 % de lipídeos/óleos de sua massa (DERMIBAS, A. e DERMIBAS, M. F., 2010), devido a esse grande potencial de acúmulo de lipídeos e ácidos graxos algumas microalgas se destacam para a produção de biocombustíveis.

Algumas técnicas são utilizadas para a conversão energética dos compostos bioquímicos extraídos das microalgas para a produção de biocombustível. As principais rotas a partir de conversão bioquímica são a fermentação e a transesterificação, enquanto a conversão termoquímica é aplicada para processos de gaseificação, pirólise, liquefação e hidrogenação (BORGES, 2010). Os processos de conversão utilizados no processamento são apresentados na Figura 7.

Figura 7- Esquema dos processos de conversão energética utilizados no processamento de microalgas.

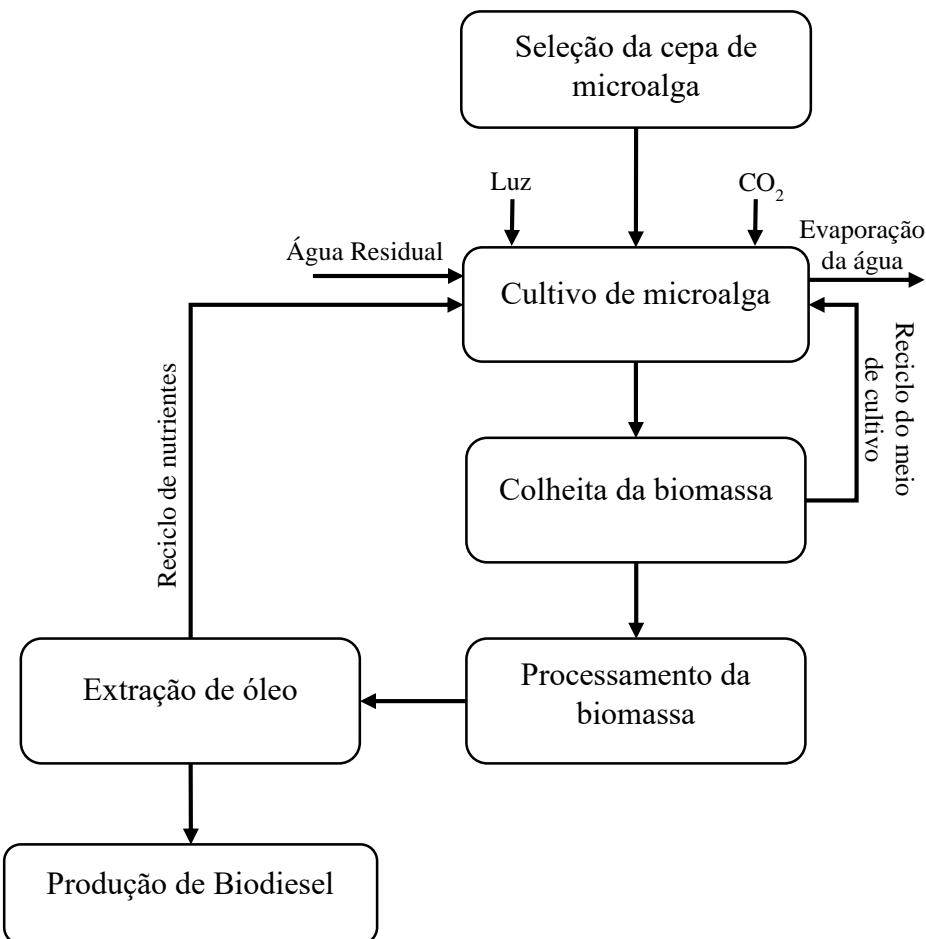


Fonte: Borges (2010).

Aos biocombustíveis produzidos a partir de microalgas, se incluem o metano produzido pela digestão anaeróbia da biomassa das microalgas (CAPSON-TOJO et al., 2017), o biodiesel derivado do óleo (RÍO et al., 2017), o biohidrogênio produzido por processos fotobiológicos (LAKSHMIKANDAN e MURUGESAN, 2016), o bio-óleo resultante da pirólise em temperaturas elevadas (BACH e CHEN, 2017) e o bioetanol (ASHOKKUMAR et al., 2017). E dentre os combustíveis renováveis mais promissores destaca-se o biodiesel, uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, produzido pela reação de um óleo ou gordura com um álcool, na presença de um catalisador (FRANCO et al., 2013).

A Figura 8 mostra uma representação esquemática da cadeia de produção do biodiesel a partir de microalgas, iniciando com a seleção de espécies, e implementação do sistema de cultivo para crescimento de microalgas. Em seguida, a colheita de biomassa, processamento e extração de óleo para abastecer a unidade de produção de biodiesel.

Figura 8- Cadeia produtiva de biodiesel a partir de microalgas cultivadas em água residual.



Fonte: Adaptado de Mata; Martins; Caetano (2010).

A produção de biodiesel a partir da biomassa de microalgas foi sugerida como promissora por ser biodegradável e sustentável, uma vez que as microalgas têm características melhoradas em relação a culturas e fontes de plantas, tais como: aumento da eficiência fotossintética, ciclo de reprodução mais curto, maior eficiência de absorção de nutrientes, teor de lipídeos e produtividade de biomassa (JAIMES-DUARTE et al., 2012; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Além de serem excelentes captadoras de CO<sub>2</sub>, por cada 100 toneladas de microalgas produzidas se consome 183 toneladas de CO<sub>2</sub> (CHISTI, 2008).

## 1.5 MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi realizada no laboratório de Engenharia Ambiental (LIA) do Instituto de Engenharia da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM) que conta com certificação de qualidade ISO 9001:2008 outorgada pelo Instituto Mexicano de Normalização e Certificação, A.C. (IMNC) com registro RSGC 960 desde a data de 11 de janeiro de 2016 vigente até 11 de janeiro de 2019.

A metodologia apresentada descreve o que foi realizado em 3 artigos científicos e primeiramente parte do pressuposto de avaliar o crescimento microalgal e a remoção de nutrientes de água residual por cultivo de *Scenedesmus obliquus* em reator de alta taxa. Após estabelecido o tempo de cultivo, foram realizados ensaios de laboratório para analisar os principais parâmetros operacionais que estão relacionados e comparar a qualidade da água antes e depois dos tratamentos (ozônio flotação e coagulação/flocação), também foram avaliados parâmetros como recuperação de biomassa, liberação de proteínas, extração de lipídeos e carboidratos e a transferência de massa de O<sub>3</sub>. Além de ser avaliado o tamanho das bolhas, viscosidade, potencial zeta na ozônio flotação para remoção das microalgas cultivadas em água residual, visando uso na produção de biocombustível. Na Figura 9 é descrito de forma resumida a metodologia experimental seguida para o desenvolvimento da pesquisa e na Tabela 3 os parâmetros avaliados, as condições experimentais e os parâmetros respostas para cada artigo.

Figura 9- Diagrama da metodologia experimental para desenvolvimento da investigação.

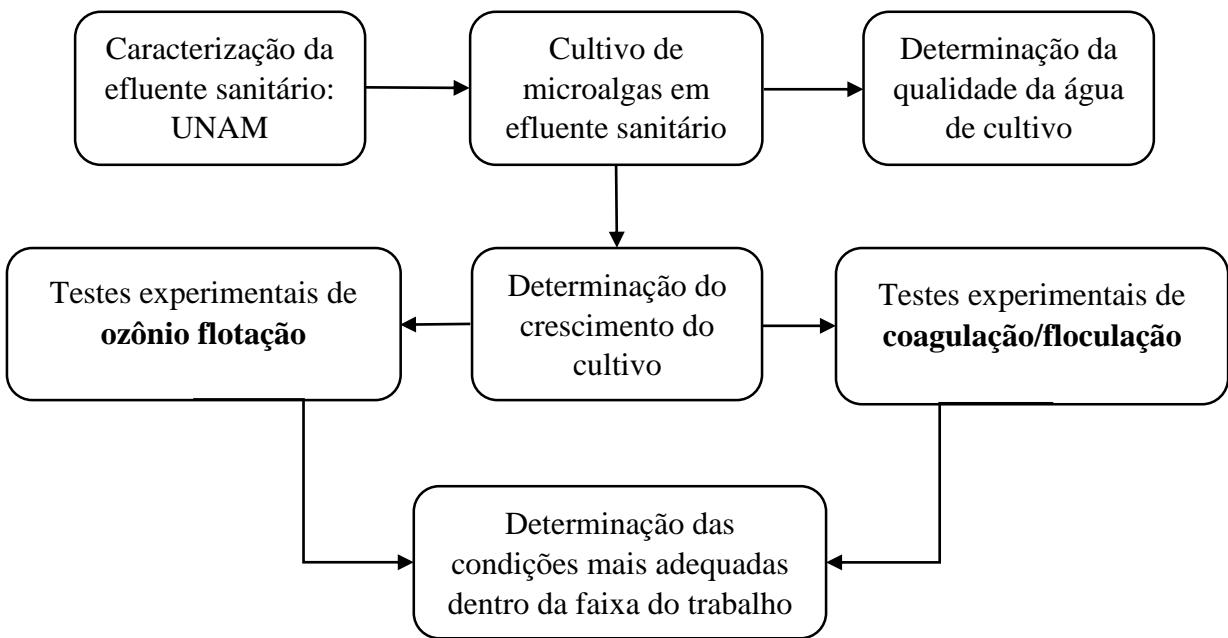


Tabela 3- Resumo dos dados utilizados para cada artigo.

| <b>Resumo experimental</b>     |   |   |   |  |
|--------------------------------|---|---|---|--|
|                                | <b>Artigo 1</b>   |   | <b>Artigo 2</b>   | <b>Artigo 3</b>  |
| <b>Método de colheita</b>      | <b>Coagulação/flocação</b>  | <b>Ozônio flotação</b>  | <b>Ozônio flotação</b>  | <b>Ozônio flotação</b>   |
| <b>Parâmetros avaliados</b>    | Concentrações de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ : 0.5, 1, 1.5, 2 e 2.5 g/L<br>Concentração de biomassa: 800 e 1200 mg/L.  | Vazão de $\text{O}_3$ : 0.2, 0.6 e 1 L/min.   | Vazão de $\text{O}_3$ : 0.2, 0.6 e 1 L/min.   | Vazão de $\text{O}_3$ : 0.2, 0.6 e 1 L/min.  |
| <b>Condições experimentais</b> | Velocidade de coag. 120 rpm; tempo de coag. 30 s; velocidade de floc. 25 rpm; tempo de floc. 12 min e tempo de sedimentação de 30 min.  | Concentração de ozônio de 0.14 mg $\text{O}_3/\text{mg}$ de biomassa; tempo de ozonização de 20 min e concentração de biomassa inicial de 500 mg/L. | Concentração de ozônio de 0.16 mg $\text{O}_3/\text{mg}$ de biomassa; tempo de ozonização de 20 min e concentração de biomassa inicial de 500 mg/L. | Concentração de ozônio de 0.16 mg $\text{O}_3/\text{mg}$ de biomassa e tempo de ozonização de 20 min.                |
| <b>Parâmetros Resposta</b>     | Curva de crescimento, remoção de nutrientes por cultivo de microalga, qualidade da água após tratamento, biomassa recuperada, proteínas, carboidratos e lipídeos na biomassa colhida, e transferência de $\text{O}_3$ . | Tamanho de bolhas, biomassa recuperada e oxidada, proteínas na agua e na biomassa recuperada, potencial zeta e transferência de $\text{O}_3$ .      | Tamanho de bolhas, biomassa recuperada e oxidada, proteínas na coluna, viscosidade e transferência de $\text{O}_3$ .                                | Tamanho de bolhas, biomassa recuperada e oxidada, proteínas na coluna, viscosidade e transferência de $\text{O}_3$ . |

### **1.5.1 Caracterização da água residual e qualidade da água**

O efluente sanitário utilizado para o cultivo das microalgas foi captada na Planta de Tratamento de Águas Residuais da UNAM que recebe os esgotos proveniente da universidade dos edifícios próximos a estação, e foram coletados antes do tratamento (esgoto bruto). Após a coleta, a água residual era filtrada para remover os sólidos grosseiros e feito uma mescla para o cultivo (14 litros de água residual com 14 litros de cultivo mãe de microalgas) e então determinado às características físico-químicas (dia 0): nitrogênio amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrato, nitrito e ortofosfato, nutrientes que influem no crescimento das microalgas. Os parâmetros foram analisados no início do cultivo das microalgas e ao longo do crescimento, com o objetivo de avaliar o tratamento da água residual realizado pela espécie *Scenedesmus obliquus*. Depois de atingido o tempo ideal de crescimento das microalgas, foram realizados os ensaios de laboratório de coagulação/flocação e ozônio flotação, após esses tratamentos também foi determinada a qualidade da água.

As metodologias aplicadas para realizar a caracterização da água residual e determinar a qualidade da água são descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Métodos utilizados para determinar os parâmetros físico-químicos das amostras de água.

| <b>Parâmetros</b>                | <b>Métodos utilizados</b>                           |
|----------------------------------|---|
| <b>Nitrogênio Total Kjeldahl</b> | *Método Kjeldahl                                    |
| <b>Nitrogênio Amoniacal</b>      | *Método Titulométrico 4500 - $\text{NH}_3\text{ E}$ |
| <b>Nitrato</b>                   | Método 8039 HACH                                    |
| <b>Nitrito</b>                   | Método 8507 HACH                                    |
| <b>Ortofosfato</b>               | Método 8178 HACH                                    |
| <b>Sólidos Suspensos Totais</b>  | *Método 2540 D                                      |

Fonte: \*APHA (2012).

### **1.5.2 Cultivo e crescimento de microalgas**

As microalgas da espécie *Scenedesmus obliquus* (Figura 10) foram cultivadas em água residual (fonte de nutrientes) em laboratório, com uma alimentação dos cultivos a cada oito dias,

com uma proporção de 10 litros de cultivo para 5 litros de água residual, visando manter a taxa de crescimento das microalgas contínua a uma concentração inicial de aproximadamente 300 mg/L, para reduzir problemas de contaminação com outras espécies. As microalgas do cultivo “mãe” foram cultivadas em recipientes PET de 5 e 10 litros, sem aeração e simulando um sistema aberto (Figura 11). E posterior crescimento em reator de alta taxa (Raceway) com capacidade de 30 L, 15 cm de altura, 115 cm de largura e 24 cm de diâmetro (Figura 12), com uma proporção inicial de alimentação do reator de 14 L de cultivo com idade de 8 dias e 14 L de água residual.

Figura 10- Microalga *Scenedesmus obliquus* utilizada para os ensaios de laboratório, com aumento de 20x.

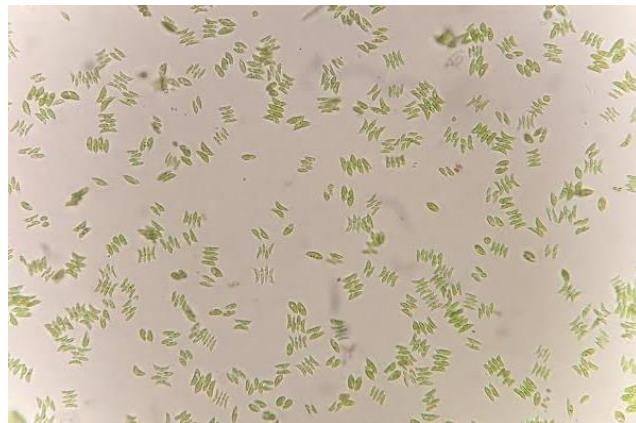


Figura 11- Cultivo de microalgas em recipientes PET mantidas em laboratório.



Figura 12- Cultivo de microalgas em reator de alta taxa (Raceway) com iluminação direta (24 horas).



Para o melhor crescimento das microalgas no reator de alta taxa foi controlada a velocidade de circulação do cultivo em aproximadamente 20 cm/s (BAHR et al., 2014) e manteve-se constante as condições luminosas (24 horas). A curva de crescimento das microalgas foi determinada pela quantidade de biomassa (SST) utilizando a metodologia dos sólidos suspensos totais (SST). Calcula-se a biomassa inicial (dia 0) e depois em intervalos de tempo (dia 2, dia 5, dia 7...), para analisar as diferentes fases de crescimento das microalgas.

Devido à alta evaporação no reator foi calculado também a biomassa real ( $TSS_r$ ) e a taxa de evaporação no reator (EV), determinadas pela Equação 25 e 26:

$$SST_r = \frac{SST * V_i}{V_d} \quad (25)$$

$$EV = \frac{V_i - V_f}{T} \quad (26)$$

Onde  $V_i$  é o volume inicial no reator (L),  $V_d$  representa o volume medido no dia (L),  $V_f$  representa o volume final no reator e  $T$  o tempo de cultivo mantido (dias).

Após determinada a curva de crescimento da *Scenedesmus obliquus*, foi mantida a mesma idade dos cultivos, em fase estacionária, para realizar os ensaios de ozônio flotação e

coagulação/flocação, visando minimizar o uso de ozônio ou sulfato de alumínio para reduzir a carga superficial das células.

### 1.5.3 Colheita por coagulação/flocação

#### 1.5.3.1 Colheita de microalgas

Os testes de coagulação/flocação foram realizados em lote, utilizando um equipamento de bancada de laboratório teste de jarros da marca Phipps & Bird - modelo 7790-900B, que mantem seis amostras em jarros com as mesmas condições de velocidade de rotação dos agitadores e tempo (Figura 13). Para todos os experimentos foi utilizado 1 litro de cultivo em cada jarro.

Figura 13– Jar test com 1 L de *Scenedesmus obliquus* utilizado para os testes de coagulação/flocação.



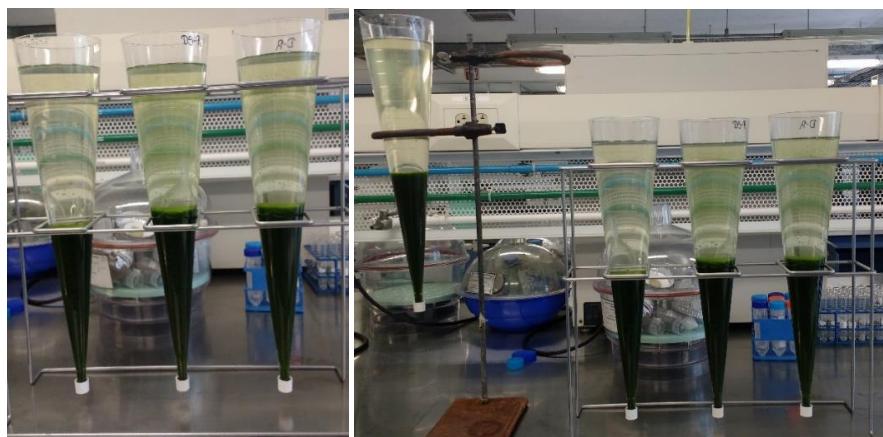
As condições de coagulação e flocação foram adotadas de acordo com o trabalho de Reyes e Labra (2016) e foram mantidas iguais para todos os experimentos (Tabela 7).

Tabela 5- Condições de funcionamento das etapas de coagulação/flocação e sedimentação.

| <b>Etapas</b>       | <b>Parâmetros</b> | <b>Valores estabelecidos</b> |
|---------------------|-------------------|------------------------------|
| <b>Coagulação</b>   | Vc (rpm)          | 120                          |
|                     | Tc (seg)          | 30                           |
| <b>Flocação</b>     | Vf (rpm)          | 25                           |
|                     | Tf (min)          | 12                           |
| <b>Sedimentação</b> | Ts (min)          | 30                           |

Após o término dos ensaios de coagulação/flocação, a sedimentação foi realizada em Cone de Imhoff (Figura 14) para separar a biomassa do sobrenadante.

Figura 14– Cone de Imhoff na etapa de sedimentação da biomassa.



#### 1.5.3.2 Ensaio experimental

Os ensaios de coagulação/flocação foram baseados em um planejamento experimental com dois fatores que devem considerar: concentração de sulfato de alumínio -  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  (g/L) em um intervalo de 0,5-2,5 g/L e concentração de microalgas (biomassa) de 800 e 1200 mg/L, sendo as variáveis de resposta: biomassa recuperada, proteína, lipídeos e carboidratos extraídos e qualidade da água. Para o experimento se utilizaram variáveis codificadas com valores de 1, 2, 3, 4 e 5 para representar as diversas concentrações de  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  e concentração de microalgas 1 e 2. Construiu-se um fatorial 5x2 com um total de 10 experimentos, sendo todos realizados em duplicata.

O planejamento experimental é apresentada na Tabela 6, determinando experimentos aleatórios com variáveis codificadas e variáveis reais.

Tabela 6- Matriz do planejamento experimental de coagulação/flocação.

| Experimentos | Matriz do planejamento experimental |   | Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub><br>(g/L) | Biomassa<br>(mg/L) |  |  |
|--------------|-------------------------------------|---|--|--------------------|--|--|
|              | Variáveis Codificadas               |   |  |                    |  |  |
|              | A                                   | B |  |                    |  |  |
| 1            | 5                                   | 2 | 2.5  | 1200               |  |  |
| 2            | 4                                   | 2 | 2  | 1200               |  |  |
| 3            | 3                                   | 2 | 1.5  | 1200               |  |  |
| 4            | 5                                   | 1 | 2.5  | 800                |  |  |
| 5            | 3                                   | 1 | 1.5  | 800                |  |  |
| 6            | 1                                   | 1 | 0.5  | 800                |  |  |
| 7            | 1                                   | 2 | 0.5  | 1200               |  |  |
| 8            | 2                                   | 2 | 1  | 1200               |  |  |
| 9            | 2                                   | 1 | 1  | 800                |  |  |
| 10           | 4                                   | 1 | 2  | 800                |  |  |

#### 1.5.4 Colheita por ozônio flotação

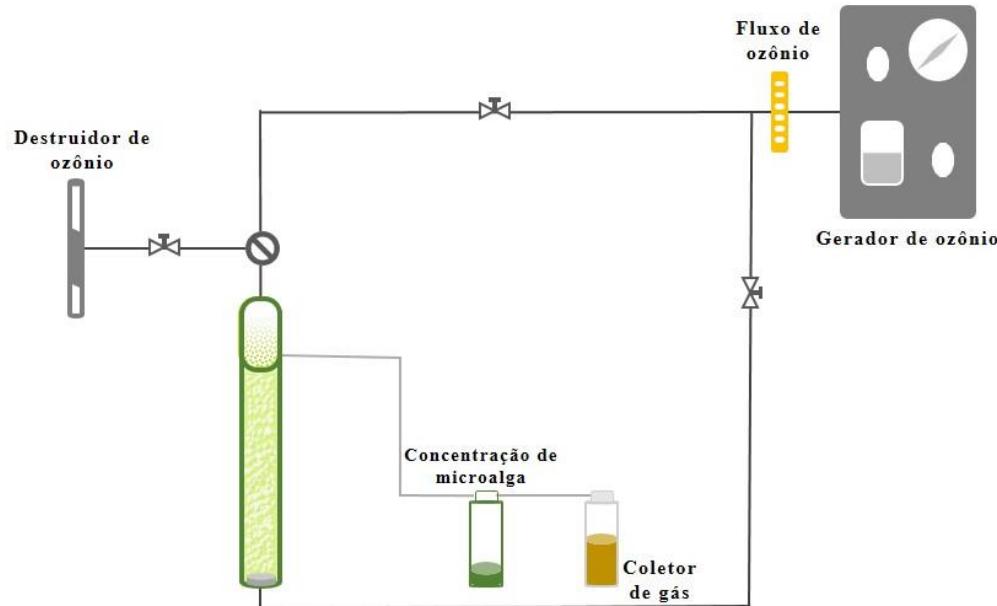
##### 1.5.4.1 Colheita de microalgas

Os testes de ozônio flotação em lotes foram realizados utilizando um reator de coluna de vidro de 1,3 L especialmente projetado com altura de 66 cm e diâmetro interno de 4,9 cm, acoplado a um gerador de ozônio Labo 76 (Emery-Trafficaz, EUA) com capacidade de produção de 19 g O<sub>3</sub>/h, utilizando ar enriquecido com oxigênio como gás de alimentação (90% ± 5% de pureza) fornecido por um separador de ar AS-12 (AirSep, EUA).

O ozônio injetado na coluna de flotação a uma vazão de O<sub>3</sub> determinada para cada ensaio, usando um difusor de vidro (10-15 µm tamanho do poro) localizado na parte inferior no centro da coluna. A coluna de flotação foi abastecida com 1 L de cultivo de microalga em água residual e recebe uma determinada vazão de O<sub>3</sub>, e então a biomassa colhida é armazenada em um coletor localizado na parte superior da coluna. Na saída do coletor conectam-se dois lavadores de gases em série, o primeiro para armazenar a biomassa colhida e o segundo para capturar o ozônio

residual. A Figura 15 apresenta a configuração experimental utilizada para a colheita de microalga por ozônio flotação.

Figura 15- Esquema do aparato experimental de colheita de microalgas por ozônio flotação.



Após os ensaios de ozônio flotação foi adicionado 20 mL de água destilada no coletor de biomassa para remover completamente a biomassa que ficava contida nas tubulações e a partir dessa biomassa foram analisados parâmetros respostas de proteínas, lipídeos e carboidratos além da biomassa recuperada. A água ozonada que permanecia na coluna realizaram-se análises de qualidade da água, viscosidade, potencial zeta, proteínas e biomassa. A porcentagem de biomassa microalgal colhida foi determinada subtraindo o teor de SST na amostra inicial pelo teor de SST colhida ao final dos ensaios e a eficiência de colheita foi determinado somando a biomassa colhida com a biomassa oxidada dividido pela concentração inicial da biomassa.

#### *1.5.4.2 Ensaio experimental*

Os testes de ozônio flotação foram divididos em três etapas:

Na primeira etapa foram determinados parâmetros de qualidade da água, biomassa recuperada, extração de lipídeos, carboidratos e proteínas na biomassa recuperada e transferência de massa de O<sub>3</sub> para comparar com o método de coagulação/flocação. Foi avaliada a vazão de ozônio (vazão O<sub>3</sub>) de 0,2, 0,6 e 1 L/min e concentração de microalgas (biomassa) de 800 e 1200 mg/L. A concentração de ozônio foi mantida em 0,14 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa e o tempo de ozonização em 20 minutos. Para realização dos testes foi feito um planejamento experimental com dois fatores a serem analisados (Tabela 7) em duplicata:

Tabela 7 - Matriz do planejamento experimental da vazão O<sub>3</sub> e biomassa.

| Experimentos | Matriz do planejamento experimental |    |                              |                 |
|--------------|-------------------------------------|----|------------------------------|-----------------|
|              | Variáveis Codificadas               |    | Variáveis Reais              |                 |
|              | A                                   | B  | Vazão O <sub>3</sub> (L/min) | Biomassa (mg/L) |
| 1            | -1                                  | -1 | 0.2                          | 800             |
| 2            | -1                                  | 1  | 0.2                          | 1200            |
| 3            | 0                                   | -1 | 0.6                          | 800             |
| 4            | 0                                   | 1  | 0.6                          | 1200            |
| 5            | 1                                   | -1 | 1                            | 800             |
| 6            | 1                                   | 1  | 1                            | 1200            |

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental da vazão de O<sub>3</sub> e altura da coluna.

| Experimentos | Matriz do planejamento experimental |    |                              |                       |
|--------------|-------------------------------------|----|------------------------------|-----------------------|
|              | Variáveis codificadas               |    | Variáveis reais              |                       |
|              | A                                   | B  | Vazão O <sub>3</sub> (L/min) | Altura da coluna (cm) |
| 1            | 0                                   | 1  | 0.6                          | 55                    |
| 2            | -1                                  | 0  | 0.2                          | 25                    |
| 3            | 0                                   | -1 | 0.6                          | 3                     |
| 4            | 0                                   | 0  | 0.6                          | 25                    |
| 5            | -1                                  | -1 | 0.2                          | 3                     |
| 6            | 1                                   | 0  | 1                            | 3                     |
| 7            | 1                                   | 1  | 1                            | 55                    |
| 8            | 1                                   | 0  | 1                            | 25                    |
| 9            | -1                                  | 1  | 0.2                          | 55                    |

Os segundos testes foram realizados para determinar a relação entre o tamanho e distribuição de bolhas, além da liberação de proteínas na coluna para analisar sua ação como agente biosurfactante e sua relação com o tamanho das bolhas, visando também analisar se ocorre a redução na coalescência e para isso foi medido o tamanho das bolhas em 3 alturas na coluna de ozônio flotação, tendo como parâmetros resposta tamanho de bolhas, biomassa recuperada e oxidada, liberação de proteína (coluna e biomassa recuperada), transferência de massa de ozônio e potencial zeta. Os parâmetros avaliados foram o vazão  $O_3$  de 0,2, 0,6 e 1 L/min e a altura da coluna de 3, 25 e 55 cm (Tabela 8). A concentração de ozônio utilizada foi de 0,16 mg  $O_3$ /mg de biomassa, tempo de ozonização de 20 minutos e concentração de biomassa de 500 mg/L.

E para a terceira etapa foram avaliadas diferentes concentrações de biomassa microalgal de 500, 700 e 1000 mg/L e vazão de  $O_3$  de 0,2, 0,6 e 1 L/min, tendo como parâmetros resposta: tamanho de bolhas, biomassa recuperada e oxidada, proteínas na coluna, viscosidade de cisalhamento e transferência de massa de  $O_3$ . Foram mantidas as mesmas condições experimentais da segunda etapa e realizados os experimentos em duplicata (Tabela 9).

Para o delineamento experimental foram utilizadas variáveis codificadas com valores de -1, 0, 1 para representar as dosagens variadas de vazão de  $O_3$ , altura da coluna de ozônio flotação e concentração de microalgas (Tabela 7, 8 e 9) e para a concentração de microalgas -1 e 1 (Tabela 7). Construiu-se um fatorial 3x2 e dois 3x3, resultando em 6, 9 e 9 experimentos, respectivamente, sendo o primeiro e o terceiro fatorial analisado em duplicata e o segundo em triplicata.

As matrizes dos desenhos experimentais são apresentadas nas Tabelas 7, 8 e 9 determinando os experimentos com as variáveis codificadas (apresentadas pelo programa MINITAB 16) e as variáveis reais. Os ensaios de laboratório se iniciaram com base nessas matrizes experimentais e se estabeleceu algumas condições. A concentração de ozônio aplicada – DOA (mg  $O_3$ /L) se calcula por (Equação 21):

$$DOA = \frac{O_3 + T + Q_{O_3}}{V} \quad (21)$$

Sendo:

$O_3$ = Concentração de ozônio na fase gasosa (mg/L);

T= Tempo de ozonização (min);

$Q_{O_3}$ = Vazão de ozônio (L/min);

V= Volume de amostra a ozonar (L).

Tabela 9- Matriz do planejamento experimental do vazão de O<sub>3</sub> e concentração de biomassa.

| <b>Matriz do planejamento experimental</b> |                              |          |                                    |                        |
|--|------------------------------|----------|------------------------------------|------------------------|
| <b>Experimentos</b>                        | <b>Variáveis codificadas</b> |          | <b>Variáveis reais</b>             |                        |
|  | <b>A</b>                     | <b>B</b> | <b>Vazão O<sub>3</sub> (L/min)</b> | <b>Biomassa (mg/L)</b> |
| 1  | -1                           | -1       | 0.2                                | 500                    |
| 2  | -1                           | 0        | 0.2                                | 700                    |
| 3  | -1                           | 1        | 0.2                                | 1000                   |
| 4  | 0                            | -1       | 0.6                                | 500                    |
| 5  | 0                            | 0        | 0.6                                | 700                    |
| 6  | 0                            | 1        | 0.6                                | 1000                   |
| 7  | 1                            | -1       | 1                                  | 500                    |
| 8  | 1                            | 0        | 1                                  | 700                    |
| 9  | 1                            | 1        | 1                                  | 1000                   |

#### 1.5.4.3 Transferência de massa de ozônio

A concentração inicial e final de ozônio na fase gasosa foi determinada pelo Método Iodométrico (BIRDSALL; JENKINS; SPADINGE, 1952), por meio de titulação indireta. O O<sub>3</sub> ao passar pela coluna de flotação era então captado em um lavador de gases contendo iodeto de potássio (KI). Devido à instabilidade do O<sub>3</sub> foi feita a quantificação logo após término do ensaio, titulando com tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>).

Primeiro o equipamento era calibrado com a dosagem de O<sub>3</sub> requerida de acordo com os desenhos experimentais, para estabelecer, era mantida a passagem de 2 L do gás pela coluna que então era capturado por um lavador de gases que continha uma concentração de iodeto de potássio (KI). Após era realizada a titulação com tiosulfato a 0.1 N, para saber a concentração de ozônio, determinada pela Equação 22:

$$C_g = \frac{N * V_{titulado} * 24}{V_g} \quad (22)$$

Onde  $C_g$  é a concentração de  $O_3$  (mg  $O_3/L$ ),  $N$  a normalidade do tiosulfato (N),  $V_{\text{titulado}}$  é o volume utilizado na titulação (mL) e  $V_g$  o volume do gás que passou pelo lavador de gases (L).

Para determinar a transferência de massa, depois de determinado o ozônio de entrada era capturado o ozônio residual ao longo dos ensaios, após o término dos ensaios titulado para determinar a concentração final. Para quantificar o  $O_3$  transferido subtrai o  $O_3$  de entrada pelo  $O_3$  de saída.

#### *1.5.4.4 Viscosidade de cisalhamento*

A viscosidade de cisalhamento foi determinada em um Reômetro (MCR101, Anton Paar Physica, Austria) com velocidade de deformação de 0.1 a 1000  $s^{-1}$  controlado pelo estresse e equipado com um cilindro geométrico concêntrico (CC27/T200 AL). Todas as medidas foram feitas em duplicata a 25 ° C.

#### *1.5.4.5 Potencial zeta*

A avaliação da estabilidade das microalgas se determinou através do potencial zeta. As determinações se realizaram em amostras que foram pré-tratadas com ozônio. Essas amostras foram obtidas ao cumprir o tempo de flotação com ozônio, mesclando a água que restava na coluna de flotação e obtendo uma amostra. Amostras do cultivo antes da ozônio flotação foi tomada como ponto de referência. A medição se realizou no equipamento Particle Sizing Systems, NICOMP (modelo NICOMP 380 ZLS).

### **1.5.5 Análises de biomoléculas**

#### *1.5.5.1 Proteínas na coluna e na biomassa colhida*

As proteínas foram quantificadas pelo método colorimétrico de Biuret (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1948), o método se quantifica pela formação de um complexo que representa uma coloração violeta a qual se pode observar a 540 nm em espectrofotômetro HACH.

### 1.5.5.2 Carboidratos

A quantificação dos carboidratos totais foi realizada pelo método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Determinada a leitura da absorbância em espectrofotômetro HACH com comprimento de onda de 490 nm.

### 1.5.5.3 Lipídeos

Os lipídeos foram quantificados pelo método colorimétrico de sulfofosfovanilina (BARNES e BLACKSTOCK, 1973), com absorbância a 530 nm em espectrofotômetro HACH.

## 1.5.6 Método de análise de imagem

Para determinar a distribuição e o tamanho de bolhas de ozônio gerados por ozônio flotação foi aplicada a técnica de análise de imagem em um sistema trifásico (água residual-ozônio-microalgas). As imagens foram capturadas por uma câmera NIKON D3400 com lente AF-S DX MICRO NIKKOR 400 MM posicionada a uma distância adequada da coluna de flotação para ajuste do foco. Visando melhorar a qualidade das imagens foram posicionadas duas lâmpadas nas laterais da coluna de flotação e uma lâmpada contrário a câmera fotográfica. Para evitar aquecimento e mudança de propriedades físico-químicas na água foram utilizadas lâmpadas de LED Osram T8 10 W com iluminação fria, montadas verticalmente.

Devido à alta turbidez da água causada pelas microalgas, as imagens foram capturadas após 5 minutos de ozonização, para que o ozônio pudesse reagir com as microalgas liberando as proteínas e iniciando a flotação, reduzindo assim a turbidez.

Para a calibração do programa uma régua foi colocada dentro da coluna de flotação com o cultivo de microalgas para calibrar as imagens por conversão de número de pixels para mm, esse procedimento foi realizado para cada ensaio. As imagens capturadas foram descarregadas em um computador com a instalação do software *Image Tools* disponível gratuitamente para o processamento de dados das imagens.

Para avaliar a coalescência das bolhas de ozônio, as imagens foram capturadas a 3 cm do fundo da coluna de flotação, no meio da coluna as imagens foram capturadas a 25 cm do fundo e no topo a 55 cm do fundo. Foram medidas manualmente 300 bolhas (BENEVENTI et al., 2009; COWARD; LEE; CALDWELL, 2015) por ensaio, para determinar a distribuição e o tamanho das bolhas. E em outro momento foram medidas em apenas uma altura da coluna (25 cm do fundo) variando a concentração de biomassa inicial (500, 700 e 1000 mg/L) para avaliar seu efeito na distribuição e tamanho das bolhas de ozônio.

O diâmetro médio das bolhas foi calculado a partir do diâmetro médio de Sauter ( $d_{32}$ ) (Equação 22), definido como:

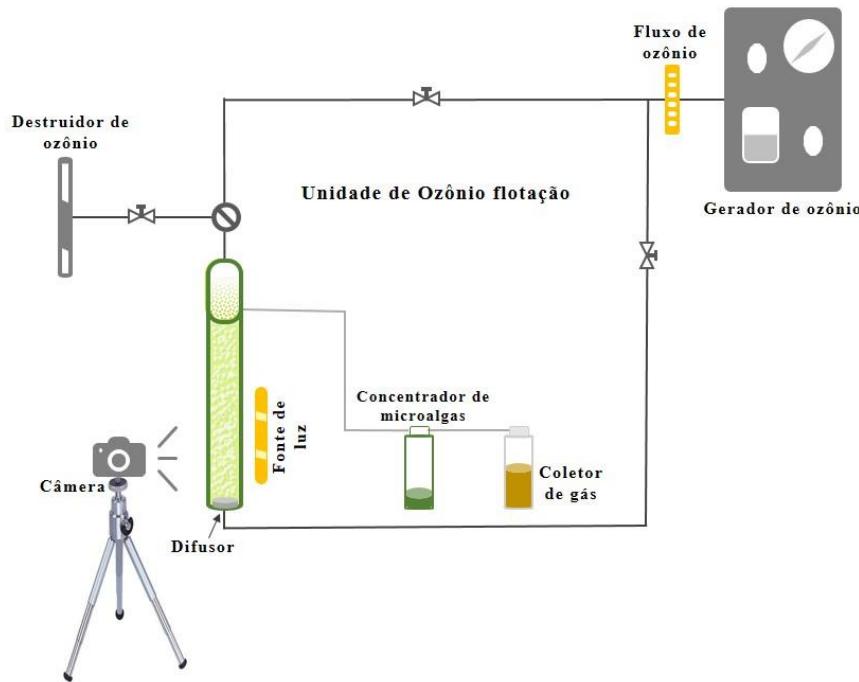
$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2} \quad (22)$$

$d_{bi}$ = diâmetro de bolhas

$n_i$ = número de bolhas

Uma apresentação esquemática da configuração experimental é apresentada de forma resumida na Figura 16.

Figura 16 - Configuração experimental para determinar a distribuição e tamanho das bolhas de ozônio na colheita de microalgas por ozônio flotação.



**2. Artigo 1 - Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a High-Rate Algal Pond**

OLIVEIRA, G. A., et al. Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond. **Bioresource Technology**. v. 259, p. 334–342, 2018. doi:10.1016/j.biortech.2018.03.072.

Gislayne Alves Oliveira<sup>a</sup>, Elvis Carissimi<sup>a</sup>, Ignacio Monje-Ramírez<sup>b</sup>, Sharon B. Velasquez-Orta<sup>c</sup>,

Rafael Teixeira Rodrigues<sup>d</sup>, \*María Teresa Orta Ledesma<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Pós Graduação em Engenharia Civil, Centro de Tecnologias, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP. 04510. CDMX, México.

<sup>c</sup> School of Chemical Engineering and Advanced Materials, Newcastle University, Newcastle

Upon Tyne NE1 7RU, England, UK

<sup>d</sup> Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

## Abstract

The removal of nutrients by *Scenedesmus* sp. in a high-rate algal pond, and subsequent algal separation by coagulation-flocculation or flotation with ozone to recover biomolecules, were evaluated. Cultivation of *Scenedesmus* sp. in wastewater resulted in complete NH<sub>3</sub>-H removal, plus 93% total nitrogen and 61% orthophosphate removals. Ozone-flotation obtained better water quality results than coagulation-flocculation for most parameters (NH<sub>3</sub>-N, NTK, nitrate and nitrite) except orthophosphate. Ozone-flotation, also produced the highest recovery of lipids, carbohydrates and proteins which were  $0.32 \pm 0.03$ ,  $0.33 \pm 0.025$  and  $0.58 \pm 0.014$  mg/mg of biomass, respectively. In contrast, there was a low lipid extraction of 0.21 mg of lipids/mg of biomass and 0.12 - 0.23 mg of protein/mg of biomass in the coagulation-flocculation process. In terms of biomolecule recovery and water quality, ozone showed better results than coagulation-flocculation.

**Keywords:** *Scenedesmus* sp., coagulation-flocculation, ozone-flotation, wastewater, high rate algal pond

## 1. Introduction

Microalgae has stood out as a renewable raw material for biofuel generation. Many of the resources required for algal mass cultivation are present in wastewater (Ni et al., 2018);

simultaneously microalgae can help remove nutrients (N, P) and metals from residual effluents (Christenson and Sims, 2011; Gupta et al., 2016). Carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) sequestration by microalgae can help offset air pollution caused by processes (Zhu et al., 2017).  $\text{CO}_2$  is the main driver of biomass and lipid generation in algal production and so is an effective way to mitigate emissions whilst also producing green energy (Eloka-Eboka and Inambao, 2017).

One of the promising genera are freshwater microalgae *Scenedesmus*, which are widely available (Das et al., 2016) and a potential alternative as feedstock for biofuel, due to their high growth rates and desirable intrinsic metabolites (Miranda et al., 2012). *Scenedesmus* have been effective in treating municipal and other industrial wastewater (Mandal and Mallick, 2009; Shen et al., 2015), efficiently fix  $\text{CO}_2$  (consumption rate  $1420.6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) and show good lipid/carbohydrate production (Ho et al., 2012) for biofuel generation. Growing algae in wastewater offers numerous economic and environmental merits, providing one of the most sustainable ways of producing biodiesel derived from microalgae (Komolafe et al., 2014).

However, an important aspect in microalgal harvesting is finding an efficient, economical and sustainable separation method for splitting algal biomass from the high proportion (~98% w) of liquid medium used for cultivation. The cost of biomass harvesting can be up to 20–30% of total biofuels production costs (Rawat et al., 2011) or approximately 50% of the energy consumption in the total biodiesel production process (Seo et al., 2016). But, most harvesting methods are not cost effective enough (Sharma et al., 2013). Disrupting algal cell walls to liberate their constituents (lipids and carbohydrates among others) and making them available for the biofuel production steps is also a challenging task for large-scale biofuel production from microalgae (Christenson and Sims, 2011).

According to Japar et al. (2017), coagulation-flocculation is one of the most suitable techniques to harvest microalgae due to its high harvesting efficiencies, moderate

operational/logistical costs, lack of negative impacts on the environment, and short harvesting time. Coagulation-flocculation for harvesting microalgae is applied by decreasing or neutralizing the surface charges of negatively charged cells through the application of chemical agents, resulting in the aggregation of cells that form flakes and allow removal by a solid-liquid separation unit. Numerous chemical coagulants or flocculants have been tested for microalgal flocculation (Rakesh et al., 2014). Metal salts (aluminum sulfate and ferric chloride) are generally preferred because they lead to improved harvesting efficiency (Ummalyma et al., 2016). Aluminum salts are usually more effective than iron salts (Papazi et al., 2010) mostly because it is economically more viable, making them useful for the recovery of *Scenedesmus* with efficiencies of 99% (c). However, the potential presence of metals in the biomass can become problematic for downstream processes (Vandamme et al., 2013). Alternative solutions to this problem include the use of plant-based bioflocculation, microbial flocculation, bioflocculation by microalgal-fungal association or autoflocculation (Ummalyma et al., 2017), using flocculants such as chitosan (Yunos et al., 2017), cationic polymers (Polydiallyldimethylammonium chloride), Superfloc (Gerchman et al., 2017) among others.

In contrast, separation using ozone-flotation has the advantage of not using chemical or biochemical agents but two physiochemical processes in one: the separation of particles by the emission of bubbles (flotation), and the oxidation of organic compounds due to the high oxidation potential of ozone. Different doses of ozone have been tested, showing an effect dependent on the liquid culture medium, morphology, microalgae structure and concentration. Betzer et al. (1980) observed for the first time, the separation of microalgae by ozone-induced flotation, with O<sub>3</sub> doses of 15 to 50 mg/L, which obtained a complete separation of the microalgae without the addition of coagulants. Nguyen et al. (2013) reported that pre-oxidation of microalgae by ozone can induce cell lysis and, therefore, the release of intracellular organic matter. Moreover, it is an effective cell

rupture method for biodiesel production with high lipid extraction and more saturated hydrocarbon products (Huang et al., 2014), and reduces the cell's surface charge (Cheng et al., 2011).

Previous studies evaluate other types of harvesting methods using microalgal biomass grown in culture medium while in this work wastewater is used for microalgal growth. Additionally, there is little information on the recovery of macronutrient components such as lipids, proteins and carbohydrates for the selected harvesting methods. The importance and efficiency of *Scenedesmus* sp. cultivation in the treatment of wastewater for nutrient removal was evaluated. After cultivation, two techniques of harvesting were compared, coagulation-flocculation which is a very efficient and proven technique for harvesting microalgae (Das et al., 2016; Reyes and Labra, 2016; Vandamme et al., 2013) and ozone-flotation, which is currently being developed (Cheng et al., 2011; Komolafe et al., 2014; Valeriano González et al., 2016; Velasquez-Orta et al., 2014; Orta Ledesma de Velásquez et al., 2017). The evaluation for both processes was performed by determining nutrient removal at different water processing stages: 1) after treatment by *Scenedesmus*, and 2) after recovering the biomass. In addition to ozone-flotation, the mass transfer of ozone and coagulation-flocculation with a dose of aluminum sulfate were evaluated.

The objective of this study was to evaluate the removal of nutrients from wastewater through a mixed microalgae culture dominated by *Scenedesmus* sp via comparison the two aforementioned methods for microalgae harvesting. The conventional harvesting method (coagulation - flocculation) and the new ozone-flotation method were compared taking into account the recovery of microalgae biomass as SST and specific biomolecules of energy interest (lipids, carbohydrates and proteins). Additionally, the removal of nitrogen and phosphorus was determined as part of an integral wastewater treatment process.

## 2. Materials and methods

## **2.1 Cultivation of *Scenedesmus* sp. in wastewater**

Biomass used was obtained from the cultivation of *Scenedesmus* sp. isolated from "Lago Nabor Carrillo" located in Texcoco, Mexico, grown in raw wastewater from a Ciudad Universitaria wastewater treatment plant. Microalgae were fed with residual water filtered to remove solids, prior to being transferred into a lab-scale High Rate Algal Pond (HRAP). The microalgae were produced in an HRAP with a capacity of 30 liters (height: 15 cm, width: 115 cm and diameter: 24 cm), cultivated in a ratio of 14 liters of wastewater to 14 liters of microalgae culture, from November 2016 to May 2017. They were kept under lighted conditions (photoperiod 24:0 light:darkness) and controlled agitation (21.6 cm/s).

Biomass concentration (as total suspended solids, TSS), was used to monitor microalgae growth and was determined, indirectly, by gravimetry using standard methods (APHA, 2005). The growth curve was determined from day zero, immediately after mixing wastewater and the culture, up to 16 days. Biomass concentration ( $TSS_r$ ) and evaporation rate (EV) were determined according to equations 1 and 2, respectively:

$$TSS_r = (TSS * V_i) / V_d \quad (1)$$

$$EV = (V_i - V_f) / T \quad (2)$$

Where  $V_i$  is the initial volume in the reactor (in L),  $V_d$  represents the volume measured on a given day (in L);  $V_f$  represents the final volume in the reactor (in L) and  $T$  is the time the culture was maintained (in days). In all harvesting analyses, microalgal growth was monitored for 14 days. After this time coagulation-flocculation and ozone-flotation tests were carried out. The percentage of microalgal biomass harvested was calculated by subtracting the  $TSS_r$  content in the initial sample from the  $TSS_r$  remaining.

## **2.2 Harvesting of *Scenedesmus* sp.**

### **2.2.1 Coagulation-flocculation**

Coagulation-flocculation tests were carried out in batches, using a Phipps & Bird model 7790-900B laboratory bench jar test, which holds six samples in cups, under the same conditions of stirrer speed and time. The following conditions were applied: (1) stirring at 120 rpm for a period of 1 min for coagulation, (2) stirring at 25 rpm for 12 min of flocculation (Reyes and Labra, 2016), and (3) a settling time of 30 min; these were used for all experiments.

### **2.2.2 Ozone-flotation**

Ozone-flotation experiments were conducted using 1L of a freshly homogenized culture of *Scenedesmus* sp. Batch flotation tests were carried out using a skimmer-type reactor, coupled to a Labo 76 ozone generator (Emery Trailigaz, USA) with a production capacity of 19 g O<sub>3</sub>/h. The biomass was harvested through a collector, which was located at the top of the reactor. Ozone was injected at the bottom of the reactor (using a glass diffuser: 10-15 µm pore size) at different flow rates (0.2, 0.6 or 1 L/min) and different concentrations (800 or 1200 mg/L biomass) for 20 minutes, to apply a dose of 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg of dry biomass which had been previously reported by Valeriano-Gonzalez, et al. 2016. The ozone concentration in the gas phase used for each test was determined using the Iodometric Method (Birdsall & Jenkins, 1952).

### **2.2.3 Experimental design**

For the experiments, a design with two factors was proposed, with variables coded to represent the ozone flux, the aluminum sulfate dose and the biomass concentration. The design involved carrying out 16 experiments, each with four replicates. The combinations of levels were

done using the statistical software Minitab 17, to obtain the best relation of the factors to the variable tested.

In the ozone-flootation tests, a 3x2 factorial was constructed, for evaluating the ozone flow rate (0.2, 0.6 and 1 L/min) and biomass concentrations (800 and 1200 mg SST/L). For coagulation-flocculation, a 5x2 factorial was constructed using doses of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  (0.5, 1.0, 1.5, 2 and 2.5 g/L) and biomass concentrations (800 and 1200 mg SST/L). The influences of these operational variables were determined for the following responses: cell biomass recovery, amount of lipids, protein and carbohydrates extracted and water quality (ammonia nitrogen, total Kjeldahl nitrogen, orthophosphate, nitrate and nitrite).

### **2.3 Water quality**

Water quality was determined on day zero and monitored during the 14 days of microalgal growth while evaluating nutrient removal and the efficiency of the cultivation of *Scenedesmus* sp. as a treatment technique for wastewater. After the treatment of wastewater with microalgae cultivation, the influence of the coagulation-flocculation and ozone-flootation treatments on water quality was also determined; to verify efficiency for the treatments the water quality was measured at the end of microalgae cultivation and after treatments. The parameters determined in water quality were total Kjehdal nitrogen (TKN) and ammonia nitrogen (APHA, 2005), orthophosphate, nitrate and nitrite (HACH 3900 spectrophotometer).

### **2.4 Biomolecules**

Total lipid, proteins and carbohydrates were extracted from the harvested microalgae biomass in coagulation-flocculation and ozone-flotation treatments. For total lipids, the sulpho-phospho-vanillin reaction by colorimetric method (Barnes and Blackstock, 1973) was used. Total proteins were quantified by the Biuret colorimetric method (Gornall et al., 1948); and total carbohydrates were determined by the colorimetric method phenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956). The initial lipid concentration ranged from 0.03 to  $0.075 \pm 0.02$  mg lipid/mg of biomass and carbohydrates from 0.06 to  $0.44 \pm 0.16$  mg carbohydrate/mg of biomass.

## **2.5 Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using R software version 3.2.2 with an analysis of variance (ANOVA) at the 5% significance level, to analyze and compare the experimental data. The null hypothesis was that there was no difference between different treatments. If  $p \leq 0.05$ , the null hypothesis was rejected, meaning that the difference was significant. If there was a significant difference between the treatments, the multiple comparisons test by the Tukey test was performed. If  $p \geq 0.05$ , the null hypothesis was accepted, that is, there was no significant difference between treatments.

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Growth and wastewater treatment by *Scenedesmus* sp.**

Fig. 1 shows the results of the growth of *Scenedesmus* sp. and the consumption of ammonia nitrogen and orthophosphate over 16 days. The maximum biomass concentration of 1200 mg/L was obtained during the 14 days with an evaporation rate of 0.8 L/day.

As observed in Fig. 1, the growth trend of microalgae was related to nutrient consumption. A high consumption of ammonia nitrogen and orthophosphate occurred until day 12, while over

that same period the exponential phase of microalgae growth occurred. A strong correlation between biomass and ammonia nitrogen consumption ( $R^2 = -0.90$ ) and biomass with orthophosphate consumption ( $R^2 = -0.97$ ) was obtained. For both, the correlation was inverse, which means that biomass accumulation was directly related to nutrient consumption.

Because of the scarcity of nutrients (day 12), the *Scenedesmus* sp. cells entered a stationary phase, and from the 14th day of cultivation, into a phase of decline and death. It is advantageous to consider the stationary phase for harvesting microalgal biomass, due to a lower metabolic activity and cell mobility, presenting higher intercellular interactions, as the zeta potential decreases (Barros et al., 2015).

Table 1 shows the efficiency of nutrient removal from residual water by *Scenedesmus* sp, achieving complete removal of ammonia nitrogen, 93% of total nitrogen removal and 61% orthophosphate removal. The higher nitrogen removal compared to phosphorus, was a consequence to the fact that the wastewater used in the study has a nitrogen deficiency (N/P: 2.3). It is known that the N/P ratio for an optimal growth of the genus *Scenedesmus* without limitations is around 30 (Rhee, 1978). According to these results, it can be concluded that the strain of *Scenedesmus* sp. can be an alternative for wastewater treatment, thanks to their ability to absorb nutrients, using them as a food source for growth. In contrast, the algal treatment resulted in an increase of nitrite and nitrate levels in the final effluent after treatment and may be a consequence of favorable conditions for nitrification. The same was observed by Gupta et al. (2016), where the species *Scenedesmus obliquus* removed the N-NH<sub>3</sub>, but resulted in an increase in the levels of nitrite and nitrate. The author related this as a consequence of favorable conditions for both, ammonia oxidation and nitrification. Lorenzen et al. (1998) also observed nitrification in the presence of microalgae and attributed it to photosynthetic oxygen.

Results from this work showed that nutrient costs can be eliminated, since no nutrients have been added for *Scenedesmus* growth besides the nutrients already present in the wastewater. At the same time, this can also help reduce the problems caused by the release of wastewater into water bodies without proper treatment.

In some studies such as that carried out by Gupta et al. (2016) the species *Scenedesmus obliquus* obtained a removal of  $99 \pm 3\%$  for nitrogen and  $98 \pm 4\%$  of orthophosphate, while Sacristán de Alva et al.(2013), using pretreated wastewater for the cultivation of *Scenedesmus acutus*, achieved 66% removal of phosphorus and 94% for organic nitrogen (94%). In another study, the cultivation of *Scenedesmus* sp. showed a maximum biomass concentration (0.90 g/L) and maximum removal of ammonia nitrogen (86%) and phosphorus (97%)(da Fontoura et al., 2017). *Scenedesmus* sp. have also been shown to effectively metabolize both nitrogen and phosphorus without suppressed assimilation of any nutrients (Kim et al., 2015).

### **3.2 Biomass and biomolecule recovery**

The use of microalgae strains for biofuel production being economically viable depends on several factors, and according to Ho et al. (2012) it is necessary that microalgae achieve the highest productivity of lipid and carbohydrate content. Achieving microalgae species with a high growth rate, lipid content and easy harvesting plus extraction may help overcome one of the major biological challenges for the production of biofuels (Greenwell et al., 2009).

Within the variables tested, the most significant effect for biomass harvesting and proteins extracted presented an ANOVA p-value of 0.004. In the case of lipids, the initial concentration of algae and aluminum sulfate dose were the most significant factors (ANOVA p-value of 0.00002 and 0.003, respectively). For carbohydrates, both the aluminum sulfate dose and the initial

concentration of algae had significant effects (p-value of 0.00) with no interaction between them (p-value of 0.13).

According to Fig. 2A, biomass harvesting values higher than 85% with a maximum recovery of 98% were obtained. For biomass harvesting, the best  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  dosage was 1 to 2.5 g/L for a microalgae concentration of 800 mg SST/L (1.3 – 3.1 mg aluminum sulfate/mg of biomass) obtaining 93-98% removal that did not statistically differ. Additionally for the biomass of 1200 mg SST/L, dosages showed no significant difference in all tested range (0.5 to 2.5 g/L of aluminum sulfate). The results of this study compared with those published by other authors are shown in Table 2. Similar results were presented by Reyes and Labra (2016) who obtained a removal efficiency of 98% using *Scenedesmus* sp. with a concentration of 1.5 g/L of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ . With the same species, Chen et al. (2013) obtained a removal of 98% after 10 min of settling with 0.3 g/L of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ .

For lipids, carbohydrates and proteins (Fig. 2B, 2C and 2D) an influence from the higher aluminum sulfate dose in the initial biomass concentration of 800 mg/L was observed. The extractions of lipids and carbohydrates (Fig. 2B and 2C) were higher for the biomass concentration of 800 mg/L, with an extraction of 0.21mg lipid/mg of biomass and 0.38 mg carbohydrates/mg of biomass. While for the proteins (Fig. 2D) the release values were 0.12 - 0.23 mg protein/mg of biomass. As shown in Fig. 2, for carbohydrates, lipids and proteins, the dose of sulfate influences the cells, that is, when the dose of coagulant applied increases, extraction increases to a certain extent. Due to the focus of the work, the concentration of metals in the biomolecules was not evaluated, however, it is recommended that further studies evaluate the influence of aluminum sulfate on biomolecules.

The best efficiency with the lowest evaluated biomass (800 mg/L) may be due to the greater contact between the coagulant and the cells, as observed by Papazi et al. (2010) in which the

addition of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  resulted in cells lysis of about 10% for the total number of cells, demonstrating a lower efficiency when using a higher concentration (1200 mg/L), even almost null the difference between the biomass harvested but with a great difference when evaluated the recovery of biomolecules.

For ozone-flotation (Figure 3), even with a low recovery of biomass (62%), there was high extraction of lipids (0.15 - 0.3 mg of lipids/mg of biomass), carbohydrates (0.25-0.3 mg of carbohydrate/mg of biomass) and proteins (0.14 – 0.5 mg of protein/mg of biomass), using a dose of ozone of 0.14 mg  $\text{O}_3$ / mg of biomass, 3- 22 times lower compared to aluminum sulfate. This is due to the ozone actions on the cells of the microalgae by reducing the surface charge and oxidizing the cells, which favors the collection of biomass and the extraction of biomolecules.

In previous studies, Velasquez-Orta et al. (2014) found a biomass recovery of 79% and a lipid yield of 0.12 mg of lipids/mg of biomass, using higher doses of ozone (0.23 mg  $\text{O}_3$ /mg of biomass) and a lower concentration of microalgae (420 mg SST/L). Valeriano-González et al. (2016), obtained a recovery of 75% of biomass, with a lipid yield of 0.16 mg lipids/mg of biomass, with the same dose of ozone used in this study (0.14 mg  $\text{O}_3$ /mg of biomass), but a lower concentration of microalgae (400 mg/L). The differences in biomass recovery obtained in this work, with respect to previous reports, are mainly due to the type of microalgae used and the required dose of ozone. In this study, a microalgal aggregation (dominated by *Scenedesmus* sp.) grown in a wastewater in a high-rate reactor was used with an evaporation rate of 0.8 L/day. The latter causes contaminants in the culture to almost duplicate in concentration which compete for the ozone used to harvest microalgae, resulting in a less efficient process. In future studies, it is advisable to adjust the dose of ozone used to compensate for secondary ozone demands.

Biomass concentration and  $\text{O}_3$  flow were significantly affecting algal recovery ( $p$ -value <0.00) for the evaluated response parameters (harvested biomass, lipids, carbohydrates, protein

and ozone mass transfer). As shown in Fig. 3A, the maximum biomass recovery was 62% with flow greater than 0.85 L/min and high biomass concentration (1200 mg/L), predominating the physical effect of the ozone flow. Not only does the recovery require a higher dose of ozone as reported by Valeriano González et al.(2016), but also a higher flow of ozone to separate the biomass. The extraction of lipids and carbohydrates was obtained with lower concentrations of biomass (Fig. 3B and 3C) with extraction higher than 0.30 mg lipid/mg of biomass and 0.30 mg carbohydrate/mg of biomass. For proteins, the best results were obtained with a gas flow less than 0.5 L/min (Fig. 3D) with values > 0.5 mg protein/mg of biomass, due to the higher concentration of ozone in contact with the biomass. As mentioned above, under these conditions, there is greater availability of ozone due to lower algal demand; this is consistent with what was obtained by Valeriano González et al. (2016), who reported greater recovery of proteins with higher concentrations of ozone.

According to the Tukey analysis, when a biomass concentration of 800 mg/L was used, no differences were found between the flows, but for the concentration of 1200 mg/L, the best flows with statistical difference were 0.6 and 1 L/min. Low ozone flow (0.2 L/min) was not efficient for the biomass harvest, probably due to the lower inlet bubble concentration and higher biomass concentration, which makes it difficult to float the microalgae. In order to achieve greater than 90% mass transfer of O<sub>3</sub> (Fig. 3E), for the range of biomass concentrations studied at 800-1200 mg/L, flows between 0.2 and 0.68 L/min were required. The largest mass transfer of ozone (95%) was achieved with a biomass of 1200 mg/L and a flow of 0.6 L/min, which did not differ statistically from the biomass of 800 mg/L for a flow of 0.2 and 0.6 L/min with transfers of 93% and 92%, respectively.

For lipid and carbohydrate extraction, the best biomass concentration was 800 mg/L, with an O<sub>3</sub> flow of 0.6 L/min for the lipids, obtaining an extraction of 0.32 mg lipids/mg of biomass; for

carbohydrates, the best O<sub>3</sub> flows were 0.6 and 1 L/min, with an efficiency of 0.33 and 0.302 mg carbohydrates/mg of biomass. Keris-Sen and Gurol (2017) reported that the application of ozone leads to cell disruption in microalgae. With a lower concentration of microalgae (800 mg/L) a higher concentration of available ozone permeates the membrane and results in a greater recovery of lipids, showing the best results compared to coagulation-flocculation.

Higher lipid extraction is observed in relation to the greater mass transfer due to the action of ozone in microalgae cells. According to Li et al. (2013) the intracellular space of the cells is occupied by lipid bodies, which is distributed in all tissues, especially in cell membranes and fat cells. Carbohydrates are similar to lipids and need treatment (O<sub>3</sub>) to break the cells, but extraction is greater with higher concentrations of biomass. Though cells contain a large portion of stored carbohydrates, cell walls also hold carbohydrates (Kim, 2015) that are easier to extract, and their extraction was not as dependent on the transfer of O<sub>3</sub> as the lipids were. For proteins the largest extractions were with the highest O<sub>3</sub> transfers, as the proteins are present in the cell wall and inside the cell (Sierra et al., 2017); the O<sub>3</sub> breaks the cells, but with less transfer this action is diminished and consequently, the extraction of proteins decreases.

### ***3.3 Nutrient removal efficiency by coagulation-flocculation and ozone-flotation***

In this study, different dosages of aluminum sulfate were used to evaluate coagulation-flocculation and varying O<sub>3</sub> gas flows were used to evaluate ozone-flotation. Both of these were also used to evaluate two biomass concentrations (800 and 1200 mg/L) in terms of nutrient removal from residual water after treatment with microalgal culture.

The experiments found high removal for nitrate and orthophosphate (> 60%) using a biomass concentration of 800 mg/L, reaching 99% of nitrate remnants with the highest dosage (2.5 g/L) of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (Table 3). However, note that the efficiency for NH<sub>3</sub>-N, TKN and nitrite was not

satisfactory (<33%), probably due to the low concentration of these in the culture since the majority was consumed by the microalgae for its growth. As already discussed, the treatment with microalgal culture in wastewater decreases or completely removes NH<sub>3</sub>-N and TKN from the water, and can complement the coagulation-flocculation technique. It can also be observed (Table 3) that the lowest nutrient removal efficiencies were with the biomass concentration of 1200 mg/L, which in contrast to the concentration of 800 mg/L, did not obtain significant removal results. This was perhaps due to a lower interaction of sulfate with the medium due to high concentration of biomass. Table 5 shows that the biomass had a greater influence (p-value <0.05) than the dose of coagulant applied; for all statistical analyzes the best efficiency in the removal of nutrients was for the biomass of 800 mg/L with a 2.5 g/L dose of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>. This may be due to the higher interaction between aluminum sulfate and nutrients when a lower concentration of biomass is applied, which decreases their interaction at higher concentrations.

In the work of Teh et al. (2014), applying coagulation-flocculation in wastewater without the presence of microalgae obtained a greater removal of TKN (51%) and 42% total phosphorus with 0.3 g/L of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, and for Ismail et al. (2012), using the same coagulant at a dose of 60 mg/L obtained 63% removal of PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>. This difference in results may be due to the initial concentration of nutrients and the absence of microalgae, which increases the nutrient-coagulant interaction.

Table 4 shows that the highest removal efficiency after treatment by ozone-flootation for nutrients (100%) was obtained for NH<sub>3</sub>-N and TKN. The maximum nitrate removal efficiency was 89% for an O<sub>3</sub> flux of 0.2 L/min and an initial biomass of 800 mg/L, and nitrite removal was greater than 86% for an O<sub>3</sub> flux of 0.6 L/min with the same biomass concentration. TKN, orthophosphate and nitrite had a significant difference (p-value <0.05) in relation to the O<sub>3</sub> flux, but only nitrate and nitrite had a significant difference in relation to biomass concentration.

According to the Tukey analysis, a difference between the averages for O<sub>3</sub> flow (for total nitrogen, orthophosphate and nitrite) was higher than 0.6 L/min. For biomass, a difference between the averages was only obtained for nitrate, which was 800 mg/L as the ideal concentration of biomass. When applying high concentrations of biomass (1200 mg/L), the results are unsatisfactory for coagulation-flocculation (Table 3). Increasing viability and decreasing treatment costs for biofuel production, energy is better with an increased concentration of microalgae. In this case, ozone-flotation technique was more efficient when using a high concentration of biomass (Table 4).

#### **4. Conclusions**

The use of *Scenedesmus* sp. for wastewater treatment proved to be efficient and advantageous, besides being an excellent producer of biomolecules. In general, the methods tested were different; coagulation-flocculation had an efficiency between 85-98% for biomass harvesting with a dose of 0.5-2.5 g/L of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> yielding 0.4 – 3.1 mg of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>/mg of biomass. Ozone-flotation recovery achieved 62% with a dose of ozone applied at 0.16 g O<sub>3</sub>/L yielding 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass. With the application of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, the microalgae yield was 3 to 22 times greater than O<sub>3</sub> doses alone. However, the deciding factors in the appropriate technology to use depend on the proposed objective regarding the evaluated parameters.

#### **Acknowledgements**

The authors acknowledge MSc. Isaura Yáñez-Noguez for her laboratory support, Eng. Erick Vielma for his valuable help in the laboratory, MEng. Maria Teresa Valeriano for her support with ozone-flotation, MEng. Regina González Balderas for her help with the lipid and carbohydrate techniques, MSc. Andrea Hernandez Garcia for her help with statistics. MEng. Gislayne Alves

Oliveira appreciates the financial support received through by the Exceed-Swindon Project. This research project was supported by the Fondo Sectorial CONACYT, project 220704. The authors are also grateful to William LaBarre for reviewing the English.

## References

- APHA-AWA-WEF, 2005. Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewater, 21 ed. APHA, Washington, DC.
- Barnes, H., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 12, 103–118. doi:10.1016/0022-0981(73)90040-3
- Barros, A.I., Goncalves, A.L., Simoes, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500. doi:10.1016/j.rser.2014.09.037
- Betzer, N., Argaman, Y., Kott, Y., 1980. Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation. *Water Res.* 14, 1003–1009. doi:10.1016/0043-1354(80)90144-X
- Chen, L., Wang, C., Wang, W., Wei, J., 2013. Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. Cultivated in an open-pond system. *Bioresour. Technol.* 133, 9–15. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.071
- Cheng, Y.L., Juang, Y.C., Liao, G.Y., Tsai, P.W., Ho, S.H., Yeh, K.L., Chen, C.Y., Chang, J.S., Liu, J.C., Chen, W.M., Lee, D.J., 2011. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. *Bioresour. Technol.* 102, 82–87. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.083
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29, 686–702.

- doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015
- da Fontoura, J.T., Rolim, G.S., Farenzena, M., Gutterres, M., 2017. Influence of light intensity and tannery wastewater concentration on biomass production and nutrient removal by microalgae *Scenedesmus* sp. *Process Saf. Environ. Prot.* 111, 355–362. doi:10.1016/j.psep.2017.07.024
- Das, P., Thaher, M.I., Abdul Hakim, M.A.Q.M., Al-Jabri, H.M.S.J., Alghasal, G.S.H.S., 2016. Microalgae harvesting by pH adjusted coagulation-flocculation, recycling of the coagulant and the growth media. *Bioresour. Technol.* 216, 824–829. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.014
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Eloka-Eboka, A.C., Inambao, F.L., 2017. Effects of CO<sub>2</sub> sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. *Appl. Energy* 195, 1100–1111. doi:10.1016/j.apenergy.2017.03.071
- Gerchman, Y., Vasker, B., Tavasi, M., Mishael, Y., Kinel-Tahan, Y., Yehoshua, Y., 2017. Effective harvesting of microalgae: Comparison of different polymeric flocculants. *Bioresour. Technol.* 228, 141–146. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.040
- Gerde, J.A., Yao, L., Lio, J., Wen, Z., Wang, T., 2014. Microalgae flocculation: Impact of flocculant type, algae species and cell concentration. *Algal Res.* 3, 30–35. doi:10.1016/j.algal.2013.11.015
- Gornall, A.G., Bardawill, Charles J., David, M.M., 1948. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.
- Greenwell, H.C., Laurens, L.M.L., Shields, R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., 2009. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J. R. Soc. Interface* 7, 703–726. doi:10.1098/rsif.2009.0322

- Gupta, S.K., Ansari, F.A., Shriwastav, A., Sahoo, N.K., Rawat, I., Bux, F., 2016. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *J. Clean. Prod.* 115, 255–264. doi:10.1016/j.jclepro.2015.12.040
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Chang, J.S., 2012. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 113, 244–252. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Huang, Y., Hong, A., Zhang, D., Li, L., 2014. Comparison of cell rupturing by ozonation and ultrasonication for algal lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Environ. Technol. (United Kingdom)* 35, 931–937. doi:10.1080/09593330.2013.856954
- Ismail, I.M., Fawzy, A.S., Abdel-Monem, N.M., Mahmoud, M.H., El-Halwany, M.A., 2012. Combined coagulation flocculation pre treatment unit for municipal wastewater. *J. Adv. Res.* 3, 331–336. doi:10.1016/j.jare.2011.10.004
- Japar, A.S., Takriff, M.S., Yasin, N.H.M., 2017. Harvesting microalgal biomass and lipid extraction for potential biofuel production: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 555–563. doi:10.1016/j.jece.2016.12.016
- Keris-Sen, U.D., Gurol, M.D., 2017. Using ozone for microalgal cell disruption to improve enzymatic saccharification of cellular carbohydrates. *Biomass and Bioenergy* 105, 59–65. doi:10.1016/j.biombioe.2017.06.023
- Kim, G.Y., Yun, Y.M., Shin, H.S., Kim, H.S., Han, J.I., 2015. Scenedesmus-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresour. Technol.* 196, 235–240. doi:10.1016/j.biortech.2015.07.091
- Kim, S.K., 2015. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances, Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*. doi:10.1016/C2013-0-19117-9

- Komolafe, O., Velasquez Orta, S.B., Monje-Ramirez, I., Noguez, I.Y., Harvey, A.P., Orta Ledesma, M.T., 2014. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. *Bioresour. Technol.* 154, 297–304. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.048
- Li, X., Pribyl, P., Bisová, K., Kawano, S., Cepák, V., Zachleder, V., Cízková, M., Brányiková, I., Vítová, M., 2013. The microalga *Parachlorella kessleri*--A novel highly efficient lipid producer. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 97–107. doi:10.1002/bit.24595
- Lorenzen, J., Larsen, L.H., Kjaer, T., Revsbech, N., 1998. Biosensor Determination of the Microscale Distribution of Nitrate , Nitrate Assimilation , Nitrification , and Denitrification in a Diatom-Inhabited Freshwater Sediment Biosensor Determination of the Microscale Distribution of Nitrate , Nitrate Assimilati. *Appl Env. Microb* 64, 3264–3269.
- Mandal, S., Mallick, N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 281–291. doi:10.1007/s00253-009-1935-6
- Miranda, J.R., Passarinho, P.C., Gouveia, L., 2012. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 555–564. doi:10.1007/s00253-012-4338-z
- Nguyen, T.L., Lee, D.J., Chang, J.S., Liu, J.C., 2013. Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 105, 246–250. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.12.017
- Ni, Z.-Y., Li, J.-Y., Xiong, Z.-Z., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., 2018. Role of granular activated carbon in the microalgal cultivation from bacteria contamination. *Bioresour. Technol.* 247, 36–43. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.079
- Orta Ledesma de Velásquez, M.T., Monje-Ramírez, I., Velasquez-Orta, S., Rodriguez-Muñiz, V., Yáñez-Noguez, I., 2017. Ozone for Microalgae Biomass Harvesting from Wastewater. *Ozone Sci. Eng.* 39, 264–272. doi:10.1080/01919512.2017.1322488

- Papazi, A., Makridis, P., Divanach, P., 2010. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *J. Appl. Phycol.* 22, 349–355. doi:10.1007/s10811-009-9465-2
- Rakesh, S., Saxena, S., Dhar, D.W., Prasanna, R., Saxena, A.K., 2014. Comparative evaluation of inorganic and organic amendments for their flocculation efficiency of selected microalgae. *J. Appl. Phycol.* 26, 399–406. doi:10.1007/s10811-013-0114-4
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl. Energy* 88, 3411–3424. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.025
- Reyes, J.F., Labra, C., 2016. Biomass harvesting and concentration of microalgae *scenedesmus* sp. cultivated in a pilot phobioreactor. *Biomass and Bioenergy* 87, 78–83. doi:10.1016/j.biombioe.2016.02.014
- Rhee, G.-Y., 1978. Effects of N : P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth , cell composition , and nitrate uptake ' 23.
- Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V.M., Cadena, E., Ortíz, E., 2013. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 146, 744–748. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.061
- Seo, Y.H., Sung, M., Oh, Y.K., Han, J.I., 2016. Lipid extraction from microalgae cell using persulfate-based oxidation. *Bioresour. Technol.* 200, 1073–1075. doi:10.1016/j.biortech.2015.10.106
- Sharma, K.K., Garg, S., Li, Y., Malekizadeh, A., Schenk, P.M., 2013. Critical analysis of current Microalgae dewatering techniques. *Biofuels* 4, 397–407. doi:10.4155/bfs.13.25
- Shen, Q.H., Jiang, J.W., Chen, L.P., Cheng, L.H., Xu, X.H., Chen, H.L., 2015. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater

- advanced treatment and lipid production. *Bioresour. Technol.* 190, 257–263. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.053
- Sierra, L.S., Dixon, C.K., Wilken, L.R., 2017. Enzymatic cell disruption of the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for lipid and protein extraction. *Algal Res.* 25, 149–159. doi:10.1016/j.algal.2017.04.004
- Teh, C.Y., Wu, T.Y., Juan, J.C., 2014. Potential use of rice starch in coagulation-flocculation process of agro-industrial wastewater: Treatment performance and flocs characterization. *Ecol. Eng.* 71, 509–519. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.07.005
- Ummalyma, S.B., Gnansounou, E., Sukumaran, R.K., Sindhu, R., Pandey, A., Sahoo, D., 2017. Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. *Bioresour. Technol.* 242, 227–235. doi:10.1016/j.biortech.2017.02.097
- Ummalyma, S.B., Mathew, A.K., Pandey, A., Sukumaran, R.K., 2016. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. *Bioresour. Technol.* 213, 216–221. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.114
- Valeriano González, M.T., Monje-Ramírez, I., Orta Ledesma, M.T., Gracia Fadrique, J., Velásquez-Orta, S.B., 2016. Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction. *Biomass and Bioenergy* 95, 109–115. doi:10.1016/j.biombioe.2016.09.020
- Vandamme, D., Foubert, I., Muylaert, K., 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends Biotechnol.* 31, 233–239. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.005
- Velasquez-Orta, S.B., Garcia-Estrada, R., Monje-Ramirez, I., Harvey, A., Orta Ledesma, M.T., 2014. Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. *Biomass and Bioenergy* 70, 356–363. doi:10.1016/j.biombioe.2014.08.022

- Yunos, F.H.M., Nasir, M., Mohd, N., Jusoh, W., Khatoon, H., Shiung, S., Jusoh, A., 2017. Harvesting of microalgae (Chlorella sp.) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan-based bio-coagulant. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 124, 243–249. doi:10.1016/j.ibiod.2017.07.016
- Zhu, B., Chen, G., Cao, X., Wei, D., 2017. Molecular characterization of CO<sub>2</sub> sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2017.05.199

## FIGURE CAPTIONS

**Fig. 1.** Growth in wastewater and consumption of ammonia nitrogen and orthophosphates of *Scenedesmus* sp. from a Raceway reactor.

**Fig. 2.** Effect of Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> dose and biomass of coagulation-flocculation: A. recovery of biomass, B. recovery of lipid per biomass, and C. recovery of carbohydrates per biomass.

**Fig. 3.** Ozone dose of 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg biomass: recovery of biomass (A), recovery of lipid per biomass (B) and recovery of carbohydrate per biomass (C) versus ozone flow and biomass of ozone-flotation, respectively.

**Table 1** Characteristics of influent and effluent with cultivation and growth of *Scenedesmus* sp.

| <b>Parameters</b>                          | <b>Inlet concentration</b> | <b>Outlet concentration</b> | <b>Removal (%)</b> |
|--|----------------------------|-----------------------------|--------------------|
| Ammonia nitrogen (mg NH <sub>3</sub> -N/L) | 69.30 ± 3.50               | 0 ± 0.0                     | 100                |
| Total Kjeldahl nitrogen (mg/L)             | 79.80 ± 0.00               | 5.6 ± 0.0                   | 93                 |
| Orthophosphate (mg/L)                      | 28.69 ± 1.81               | 11.25 ± 0.11                | 61                 |
| Nitrate (mg/L)                             | 1.75 ± 0.05                | 48.14 ± 0.62                | -                  |
| Nitrite (mg/L)                             | 0.007 ± 0.001              | 0.548 ± 0.001               | -                  |

-not detected.



**Table 2** Coagulation-flocculation conditions used by different studies for the harvesting of microalgae biomass.

| Reference              | Culture medium | Microalgae             | Microalgae concentration (mg/L) | $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (g/L) | Biomass recovery (%) | Yield (mg biomass/ mg $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ) |
|------------------------|----------------|------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------|--|
| Chen et al. (2013)     | Bold's         | <i>Scenedesmus</i> sp. | 540                             | 0.3                                | 98                   | 1.8  |
| Gerde et al. (2014)    | Fertilizers    | <i>Scenedesmus</i> sp. | 1000                            | 0.3                                | 90                   | 3.0  |
| Reyes and Labra (2016) | Z8             | <i>S. spinosus</i>     | 400                             | 1.5                                | 98                   | 0.3  |
| This study             | Wastewater     | <i>Scenedesmus</i> sp. | 1200                            | 0.5                                | 95                   | 2.3  |

**Table 3** Removal of nutrients by coagulation-flocculation after pre-treatment with *Scenedesmus sp.*

| Parameters  |                                 | NH <sub>3</sub> -N            |             | Total nitrogen               |             | Orthophosphate               |             | Nitrate                      |             | Nitrite                      |             |
|---|---------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|------------------------------|-------------|
| Dose of Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (g/L) | Microalgae concentration (mg/L) | Remnant concentration* (mg/L) | Removal (%) | Remnant concentration (mg/L) | Removal (%) |
| 0.5   |                                 |                               | 0           |                              | 20          |                              | 60          |                              | 53          |                              | 6           |
| 1   |                                 |                               | 17          |                              | 20          |                              | 75          |                              | 65          |                              | 3           |
| 1.5   | 800                             | 4.2                           | 0           | 7                            | 30          | 10.7                         | 89          | 3.5                          | 67          | 0.4                          | 1           |
| 2   |                                 |                               | 33          |                              | 20          |                              | 87          |                              | 75          |                              | 4           |
| 2.5   |                                 |                               | 0           |                              | 30          |                              | 76          |                              | 99          |                              | 5           |
| 0.5   |                                 |                               | -           |                              | -           |                              | 0           |                              | 5           |                              | 0.9         |
| 1   |                                 |                               | -           |                              | -           | 15.5                         | 0.6         | 7.7                          | 5           |                              | 1.0         |
| 1.5   | 1200                            | -                             | -           | -                            | -           |                              | 0.8         |                              | 3           | 0.5                          | 0.2         |
| 2   |                                 |                               | -           |                              | -           | 7.8                          | 0.9         |                              | 2           |                              | 0.5         |
| 2.5   |                                 |                               | -           |                              | -           |                              | 0.7         | 22.6                         | 1           |                              | 0.3         |

\*measured after treatment with microalgae; -not detected.

**Table 4** Removal of nutrients by ozone-flotation after pre-treatment with *Scenedesmus sp.*

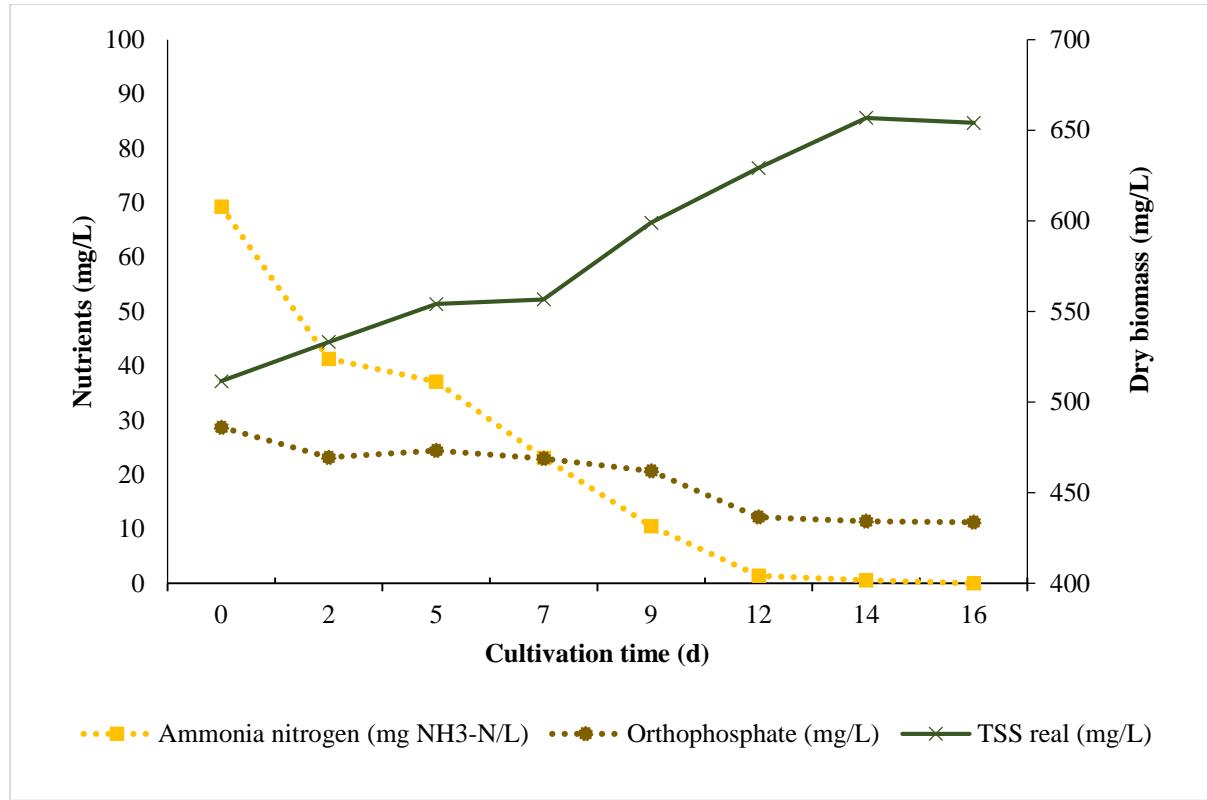
| Parameters                     |                                       | NH <sub>3</sub> -N                              |                | Total nitrogen                     |                | Orthophosphate                     |                | Nitrate                            |                | Nitrite                            |                |
|--------------------------------|---------------------------------------|---|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|------------------------------------|----------------|
| O <sub>3</sub> Flow<br>(L/min) | Microalgal<br>concentration<br>(mg/L) | Remnant<br>concentration <sup>*</sup><br>(mg/L) | Removal<br>(%) | Remnant<br>concentration<br>(mg/L) | Removal<br>(%) | Remnant<br>concentration<br>(mg/L) | Removal<br>(%) | Remnant<br>concentration<br>(mg/L) | Removal<br>(%) | Remnant<br>concentration<br>(mg/L) | Removal<br>(%) |
| 0.2                            |                                       |   | 100            |                                    | 100            |                                    | 2              |                                    | 89             |                                    | 97             |
| 0.6                            | 800                                   | 4.2   | 100            | 4.2                                | 100            | 4.2                                | 6              | 4.2                                | 88             | 4.2                                | 86             |
| 1                              |                                       |   | 100            |                                    | 50             |                                    | 3              |                                    | 88             |                                    | 96             |
| 0.2                            |                                       |   | -              |                                    | -              |                                    | 2              |                                    | 79             |                                    | 99             |
| 0.6                            | 1200                                  | -   | -              | -                                  | -              | 16                                 | 11             | 48.8                               | 83             | 0.5                                | 97             |
| 1                              |                                       |   | -              |                                    | -              |                                    | 5              |                                    | 77             |                                    | 99             |

\*measured after treatment with microalgae; - not detected.

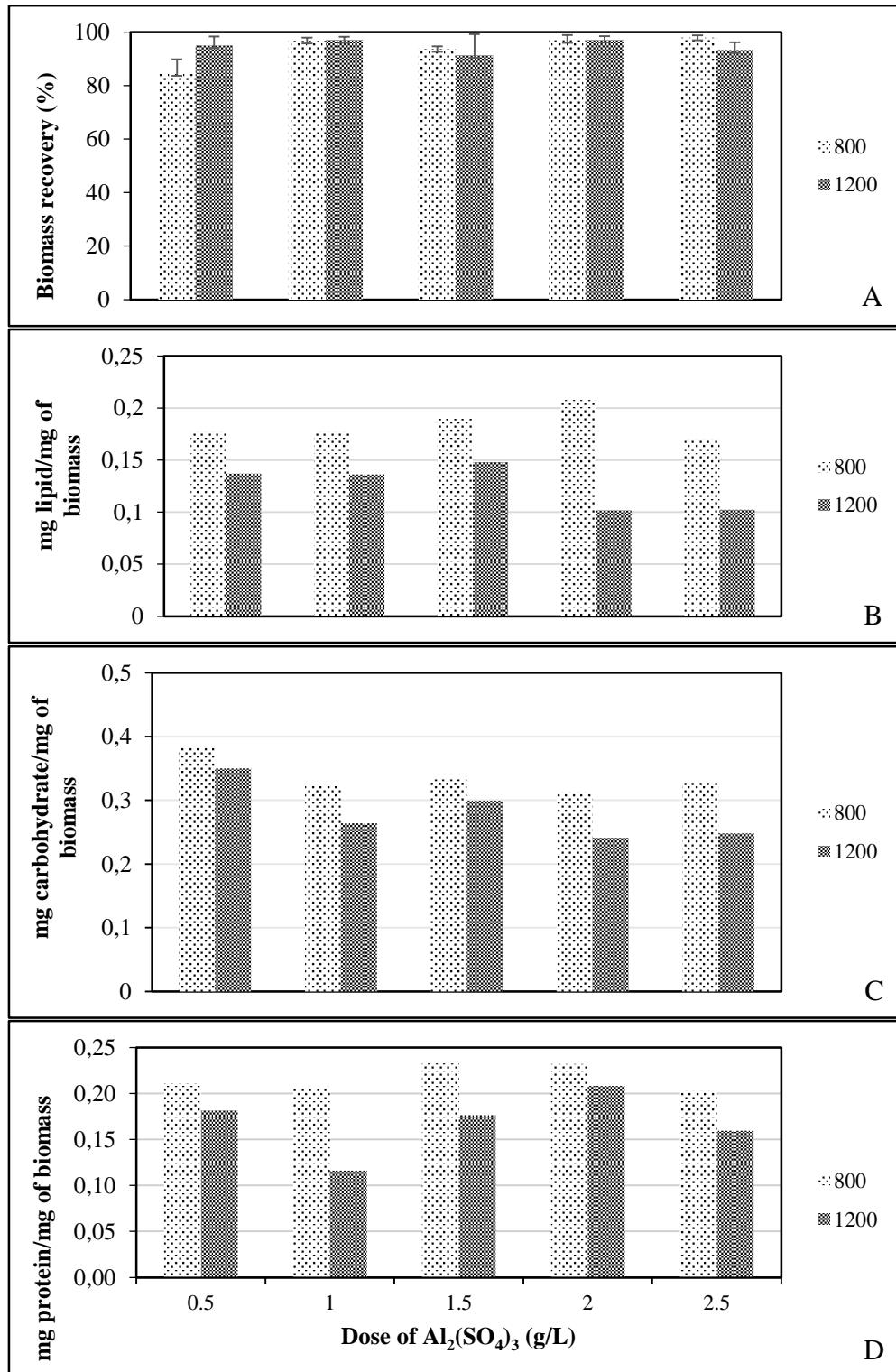
**Table 5** Experimental significance of tested variables in coagulation-flocculation and ozone-flotation. The confidence level used was 95%.

|   | <b>p-value</b>          |            |                       |                |                |
|---|-------------------------|------------|-----------------------|----------------|----------------|
|   | <b>NH<sub>3</sub>-N</b> | <b>NTK</b> | <b>Orthophosphate</b> | <b>Nitrate</b> | <b>Nitrite</b> |
| <b>Coagulation-Flocculation</b>                                   |                         |            |                       |                |                |
| <b>A:</b> Dose of Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> | 0.072                   | 0.112      | 0.133                 | 7.50E-09       | 0.980          |
| <b>B:</b> Biomass   | 0.027                   |            | 0.00                  | 0.00           | 0.279          |
| <b>AB</b>   | 0.072                   |            | 0.174                 | 1.38E-10       | 0.988          |
| <b>Ozone-Flotation</b>  |                         |            |                       |                |                |
| <b>A:</b> O <sub>3</sub> Flow                                     | 0.387                   | 0.00       | 0.027                 | 0.401          | 0.004          |
| <b>B:</b> Biomass   | 0.331                   |            | 0.268                 | 1.20E-04       | 0.002          |
| <b>AB</b>   | 0.387                   |            | 0.697                 | 0.313          | 0.024          |

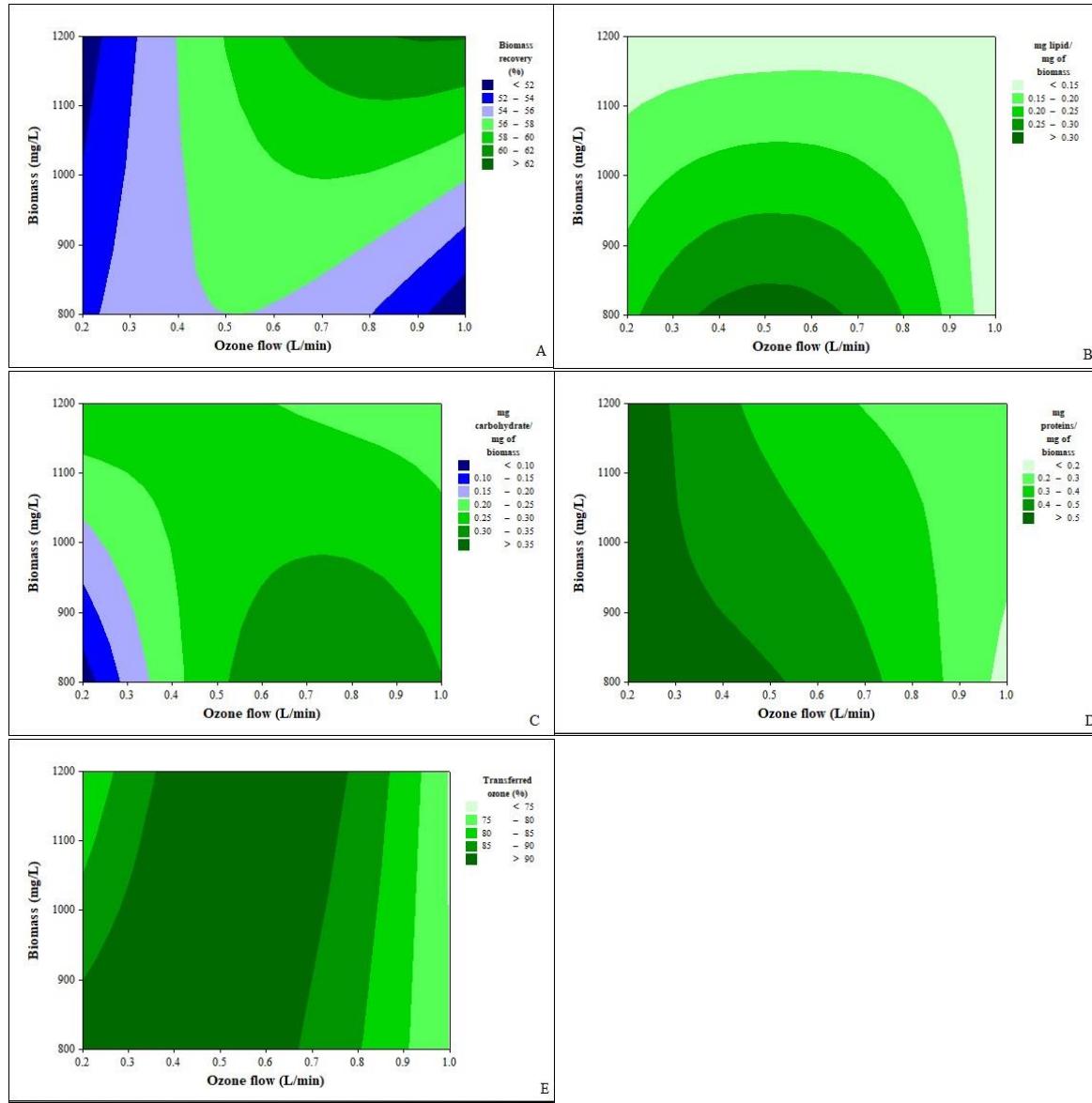
**Figure 1.** Growth in wastewater and consumption of ammonia nitrogen and orthophosphates of *Scenedesmus* sp. from a Raceway reactor.



**Figure 2.** Effect of  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  dose and biomass of coagulation-flocculation: A. recovery of biomass, B. recovery of lipid per biomass, and C. recovery of carbohydrates per biomass.



**Figure 3.** Ozone dose of 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg biomass: recovery of biomass (A), recovery of lipid per biomass (B) and recovery of carbohydrate per biomass (C) versus ozone flow and biomass of ozone-flotation, respectively.



### 3. Artigo 2 – The effect of bubble size distribution on the release of microalgae proteins by ozone-flotation

Gislayne Alves Oliveira<sup>1</sup> · Ignacio Monje-Ramirez<sup>2</sup> · Elvis Carissimi<sup>1</sup> · Rafael Teixeira Rodrigues<sup>3</sup> ·

Sharon B. Velasquez-Orta<sup>4</sup> · Alma Concepción Chávez Mejía<sup>2</sup> · \*María Teresa Orta Ledesma<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Pós Graduação em Engenharia Civil, Centro de Tecnologias, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, CDMX, México

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia de Minas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> School of Chemical Engineering and Advanced Materials, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne NE1 7RU, England, UK

#### Abstract

Interest in sustainable energy production is one of the most important resources in the development of technologies, and one of the promising sources is the use of microalgae as a raw material. These are obtained in nature, do not need good conditions to develop, occupy a small area for growth and replace the use of food products for the production of biofuel. However, one of the biggest hurdle is the biomass harvest and one of the innovative techniques being proposed is ozone-flotation. Flotation processes are influenced by the physical characteristics of bubbles and particles, and therefore it is necessary to investigate the size distribution of generated bubbles, their action in microalgal cells and the oxidation and release of proteins that act as biosurfactants. In this work the effect of ozone bubble size in a three-phase system (ozone – wastewater - microalgae) and size of microalgal particles separated by ozone-flotation were evaluated. Three ozone flows were used (0.2, 0.6 and 1 L/min). Best results were obtained with a flow of 0.6 L/min achieving 88.5% efficiency, increased biomass oxidation, destabilization of microalgal cells (zeta potential 3.17 mV), highest protein release (46.7 mg/L) and, a demonstrated efficiency of proteins in reducing bubble coalescence. Regarding the latter, no differences in size or distribution of the ozone bubbles were obtained between the 3 evaluated heights of the column (bottom, middle and top). At this flow the mean bubble diameters were maintained at 1910, 2028 and 2071 µm for bottom, middle and top, respectively, with approximately 50% of the bubbles concentrated up to 2000 µm. In addition, due to the higher action of ozone with microalgal cells, smaller particle sizes in the column were found due to the oxidizing action of ozone.

**Keywords:** *Scenedesmus* sp.; Wastewater; Biosurfactant; Ozone bubble size; Digital image analysis.

#### Introduction

The use of microalgae as a source of biofuel has stood out as a renewable raw material in part because many of the resources required for mass cultivation can be supplied by sewage [1] which promotes the removal of nutrients and metal ions [2,3]. When compared to fossil fuels, microalgae biofuels are renewable, biodegradable,

and an important non food-based alternative [4]. Microalgae are fast growing in adequate environmental conditions and produce significant amounts of lipid and carbohydrates, in a small footprint.

However, one of the major challenges for using microalgae in biofuel production is an efficient harvesting method. Normally, harvesting processes are based on different physicochemical and biological properties of microalgae. Flotation has emerged as a promising unit operation for microalgae harvesting due to the tendency of microalgae to float instead of settle, and less energy is used compared to centrifugation. In order to achieve adequate contact angle between bubbles and microalgae, the cells of the microalgae must be hydrophobic; this can be achieved through the addition of surfactants or coagulants [5] which alter the dynamic properties of the interface, and therefore affect the surface charges and the stability of the foam during flotation [6]. Added chemicals aim to enhance particle separation, increase contact between air and solid particles and improve the likelihood of adhesion [7]. However, the presence of metal ions in biomass resulting from coagulants can become problematic for downstream processes [8] since it is toxic to the cells [9]. In this case the application of ozone flotation is an advantageous method that does not require flocculants or to lower the pH [10] and, instead, stimulates the flotation capacity of microalgae.

Bubble-particle interactions have been widely shown to be the most important sub-process in flotation [11]; bubbles are the key of flotation, where bubbles attach to hydrophobic particles and carry them to the froth layer [12]. Within the liquid pool, bubble motion facilitates mixing and therefore increases the likelihood of algae/bubble interaction [13]. The bubbles provide the interface for microalgal cell binding and carry the microalgae bound to the foam-liquid interface [14].

The main individual elementary steps of flotation are the collision of a solid particle with a bubble, attachment and adhesion of a particle to a bubble and detachment of a particle from a bubble [12,15–21]. The collection mechanism is one in which the bubbles attach to hydrophobic particles or microalgae the formation of a finite contact angle at the gas–liquid–solid contact line [22].

An effective way to improve interaction, binding and stability efficiencies in the bubble/microalgae relationship is to reduce the size of the bubbles, thus increasing the surface area per unit volume and increasing the probability of interaction between bubbles and algae [23]. Apart from size, small bubbles also affect the mass transfer of ozone, and help decrease the use of excess costly ozone. In ozone flotation, ozone bubbles cause oxidation when in contact with microalgae cells, releasing proteins that exhibit surfactant properties, and thus reduce the surface tension of water [22].

The addition of surfactants reduces bubble coalescence and push bubbles in the slurry zone towards the foam phase, due to an increase in air bubble residence time [24]. Ozone also reduces the surface charge of cells (measured in terms of zeta potential) and increases the extraction of lipids and carbohydrates due to its oxidizing action. Proteins released from highly bound allogenic organic matter are essential for both modifying the hydrophobicity of bubble surfaces for easy cell attachment and for forming an upper foam layer to collect floating cells [25].

There are currently few works that have evaluated the bubble-particle relationship in flotation, and the majority of such literature is for two-phase systems, because three-phase systems (solid–liquid–gas) are particularly complex [26]. Additionally, the bubble-microalgae relationship is strongly related to the transfer of ozone mass to the cells of microalgae which cause a reduction in the surface charge of the cells, thereby causing

these microalgae to agglomerate and float. Also, ozone oxidizes the cells favoring liberation of biomolecules, including proteins that reduce the surface tension of water.

The three-phase system works with minerals, with air-water-quartz and talc [27], air-water tap water-glass particles [12], air-Milli Q water-alumina and silica [28], water-air-phosphate ore [24], air-water-silica [29], air-water-quartz [30], and air-water-barite [31]. Coward et al. [14] evaluated the size of air bubbles with different spargers with *Chlorella*, but determined the size of the bubbles before harvest with the addition of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Beneventi et al. [32] used the ozone flotation column for deinking papers and determined the size of the bubbles and the transfer coefficient of ozone, but to determine the size of the bubbles the authors used air bubbles.

The aim of this work was to investigate, for the first time, the effect of ozone bubble size distribution and microalgal size in a three-phase system (ozone-wastewater-microalgae). Three ozone flow setups were used to evaluate the effect of protein release as a biosurfactant, helping in the coalescence of ozone bubbles by ozone flotation.

## **Materials and Methods**

### **Cultivation of *Scenedesmus* sp. in wastewater**

The biomass used was obtained from the cultivation of microalgae containing a majority of *Scenedesmus* sp. grown in raw wastewater from a Wastewater Treatment Plant from the Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, Universidad Nacional Autónoma de México. The microalgae was produced in a High Rate Algal Pond (HRAP) at lab scale with a capacity of 30 L, cultivated in a ratio of 14 L of wastewater to 14 L of microalgae culture. Biomass concentration as total suspended solids (TSS) was determined, indirectly, by gravimetry using standard methods (APHA 2005). The amount of biomass harvested was calculated by dividing the biomass harvested by the initial biomass concentration and the oxidized biomass was calculated from the initial biomass by subtracting the harvested biomass and the biomass that remained in the flotation column. The particles of microalgae were visualized in Axio Lab.A1 microscope combined with the Axiocam ERc 5s microscope camera to capture the images of the microalgae cells that were modified and measured the particle size (130 particles) of 20 captured images in the Zen imaging software. The particle size distribution for the initial biomass were determined using a LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer coupled to Universal Liquid Module (ULM), which is based on the principle of diode laser light scattering ensemble.

### **Ozone Flotation**

Ozone-flotation experiments were carried out in batch and bench scale using 1L of a freshly homogenized culture of *Scenedesmus* sp. in a glass column reactor (height: 66 cm, inner diameter: 4.9 cm) with closed in line system avoiding the ozone flight. The ozone produced by to a Labo 76 ozone generator (Emery Trailigaz, USA) with a production capacity of 19 g O<sub>3</sub>/h, was injected in the bottom of the reactor using a glass diffuser (10-15 µm pore size) located in the central axis of the cell, which dispersed the ozone in the liquid medium with different

ozone flow rates (0.2, 0.6 and 1 L/min) for 20 minutes and ozone gas concentration in the gas phase (18.2, 6.67 and 4.22 mg O<sub>3</sub>/L), in order to apply a dose of 0.16 mg O<sub>3</sub>/mg of dry biomass and a biomass concentration of 500 mg/L. The ozone concentration in the gas phase used for each test was determined using the Iodometric Method [33]. The percentage of transferred ozone was calculated as follows:

$$\% \text{ Transferred ozone} = \left( \frac{\text{Ozone In} - \text{Ozone Out}}{\text{Ozone In}} \right) * 100\%$$

### Bubble size determination

Bubbles generated during ozone-flotation were measured in a three-phase system (wastewater-ozone-microalgae) applying a visual technique with image analysis. The images were captured by a NIKON D3400 digital still camera with an AF-S DX MICRO NIKKOR 400 MM lens positioned at a suitable distance (29.7 cm) from the flotation column for focus adjustment. Shutter speed was 1/1000 and ISO sensitivity of 400, this allowed to capture bubble images without blur. The flotation column was backlit using illumination assisted with a cold light, with three vertically mounted Osram T8 10 W LED lamps. One lamp was placed on the opposite side of the camera and the other two on the sides of the flotation column. Example of the obtained photograph are shown in Fig. 1.



Fig. 1 Example of the obtained photograph by ozone-flotation to determine bubble size.

A computer with special software for image data processing and analysis (Image Tools) was used. Image size obtained was 6000 x 4000 pixels (24 Megapixels) and 24 bits color. The *Image processing* basically included the following *steps*: calibrate spatial measurements (for the transformation of number of pixels to μm), and then draw lines over the bubbles to determine the diameter of each bubble.

Due to the great turbidity of the water caused by the microalgae, the images were captured after 5 minutes of ozone flotation so that ozone could react with microalgae by releasing proteins to harvest biomass. A ruler was placed inside the flotation column with the culture to calibrate the images by conversion to pixel number; this was done for each height of column and ozone flow.

To evaluate the coalescence of bubbles, the images were captured 3 cm from the bottom of the flotation column; from the middle of the column the images were captured 25 cm from the bottom and from the top, 55 cm from the bottom. About 300 bubbles [14,32] (10 images) were measured manually (software Image Tools) for the

determination of the size distribution in each experimental run. The mean bubble diameter adopted was the Sauter diameter, calculated by equation:

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2}$$

where:  $d_{bi}$  is the bubble diameter and  $n_i$  is the number of bubbles.

A schematic representation of the experimental setup is shown in Fig. 2.

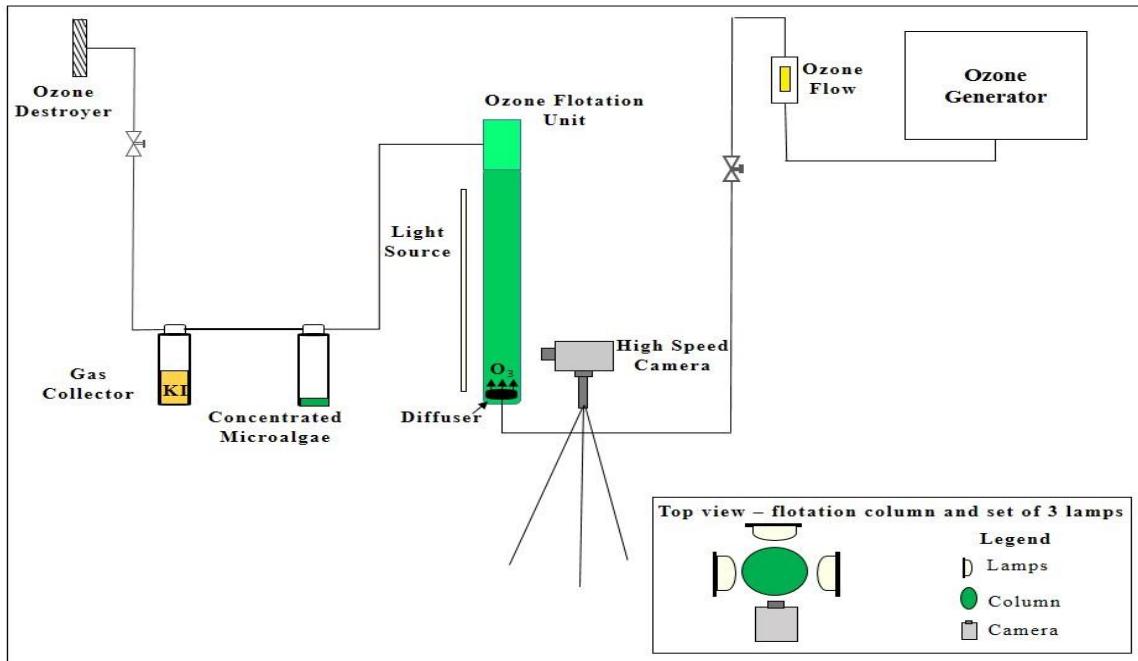


Fig. 2 Experimental setup for testing ozone-flotation to determine bubble size distribution.

## Zeta potential

Stabilization of the microalgae was determined by the zeta potential. The zeta potential of the microalgae culture (initial sample) was taken as a reference point to evaluate the effect of ozone on the cells after harvesting by ozone-flotation. After completion of the microalgae harvest by ozone-flotation (ozonation time for all tests was 20 minutes) the water remaining in the flotation column was then blended to obtain only one final sample for determination of the zeta potential. The zeta potential was measured with a particle sizing systems ZLS zeta module that fits into the Dynamic Light Scattering (DLS) technique, using Particle Sizing Systems equipment, NICOMP (model NICOMP 380 ZLS). This technique actually measures the electrophoretic mobility of the particles and converts this measurement to zeta potential based on Smoluchowski equation with sample temperature 25 °C. The determination was made in triplicate.

## **Protein in the flotation column and in the harvested biomass**

The total protein content was determined by the Biuret colorimetric method as described by Gornall et al. [34]. From the harvested biomass, a 0.125 g portion was taken and 17 mL of water at pH 12 was added and maintained for 1 hour at 40 °C under stirring. Afterwards, it was centrifuged to separate the supernatant from the proteins. Then 500 µL of that supernatant was measured and 500 µL of Milli Q water was added for analysis of the proteins in the harvested biomass. For the proteins in the flotation column, 1 mL of column water was filtered after ozonation. After measuring 1 mL from both forms, 4 mL of biuret reactive was added and stirred, then held for 30 min and read on a HACH spectrophotometer at 540 nm.

## **Experimental design**

For ozone-flotation, a design with two factors was proposed, with variables coded to represent the ozone flow rates (0.2, 0.6 and 1 L/min) and column height at the bottom, middle and top (3, 25 and 55 cm, respectively). The design involved carrying out 27 experiments, each with three replicates. The influences of these operational variables were determined for the following responses: bubble size, particle size, mass transfer of ozone, protein in column flotation and biomass harvested, biomass recovery, oxidized biomass and zeta potential.

## **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using statistical software MINITAB version 16. Data were tested for normality using an Anderson-Darling Normality Test. Normally distributed data were compared using an analysis of variance (ANOVA) at the 5% significance level, to analyze and compare the experimental data the Tukey test was used. For data not normally distributed, a non-parametric analysis of variance (nonparametric ANOVA) was applied using the Mood's Median Test.

## **Results**

### **Ozone bubble size distribution and protein release in ozone-flotation**

The bubble size distribution from three heights in the flotation column and protein release within the different ozone flow conditions is shown in Fig. 3.

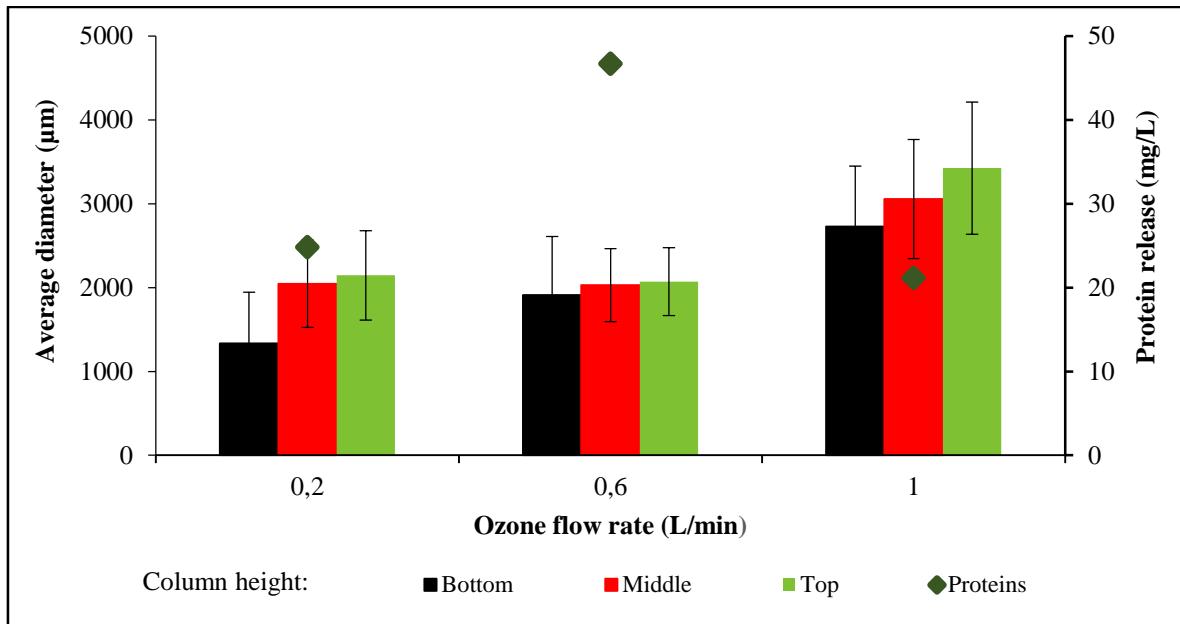


Fig. 3 Average diameter of ozone bubble size at three heights (bottom, middle and top) in triplicate measured 900 bubbles the column and protein release with three ozone flow rates in ozone flotation.

Ozone bubble size is directly influenced by the ozone flow rate (*p*-value 0.000) (Table 1); the greater the O<sub>3</sub> flow the larger the bubble size. The size varied from 1334 ± 613.21 μm (flow 0.2 L/min, bottom) to 3426 ± 699.35 μm (flow 1 L/min, top). For flow rates of 0.2 or 1 L/min, a greater variation in bubble size was observed at different column heights, when compared to the flow rate of 0.6 L/min, produced a lower variation in ozone bubble size, and a higher protein release (46.7 ± 18.8 mg/L) was found, already for the fluxes 0.2 and 1 L/min. the values of released proteins were low (24.8 ± 11.9 and 21.2 ± 14 mg/L, respectively).

For a flow rate of 0.2 L/min, there was a statistical difference between the bottom and middle height bubbles, bottom and top bubbles (*p*-value 0.000), but not between middle and top bubbles (*p*-value 0.203). And for the O<sub>3</sub> flow of 1 L/min, bubbles were different at all heights (*p*-value 0.000). At a flow rate of 0.6 L/min, there was no statistical difference between the bottom and middle (*p*-value 0.073) nor between the middle and top bubbles (*p*-value 0.479) (Table 1).

Table 1 Statistical results for ozone fluxes and column heights analyzed.

| O <sub>3</sub> flow (L/min) | Column height | P-value | O <sub>3</sub> flow (L/min) | Column height | P-value |
|-----------------------------|---------------|---------|-----------------------------|---------------|---------|
| 0.2                         | bottom/middle | 0.000   | 1                           | bottom/middle | 0.000   |
|                             | bottom/top    | 0.000   |                             | bottom/top    | 0.000   |
|                             | middle/top    | 0.203   |                             | middle/top    | 0.000   |
| 0.6                         | bottom/middle | 0.073   | 0.2 / 0.6 / 1               | bottom        | 0.000   |
|                             | bottom/top    | 0.055   |                             | middle        | 0.000   |
|                             | middle/top    | 0.479   |                             | top           | 0.000   |

The bubble size distribution differed according to flows used (Fig. 4a, b and c). A flow of 0.2 L/min produced small bubbles at the bottom, and had a peak of 32% of the bubbles between 500 and 1000 μm. The size

of the bubbles increased in the middle and top, where there was the same frequency and size distribution of bubbles (Fig 3a), with a peak between 1500 and 2000  $\mu\text{m}$  with 34% of the bubbles in the mean and 33% of the bubbles in the top of that range with greater bubble concentrations found from 1000 to 3500  $\mu\text{m}$  with a Sauter diameter of 1834  $\mu\text{m}$  at the bottom, 2302  $\mu\text{m}$  in the middle and 2415  $\mu\text{m}$  at the top (Fig. d).

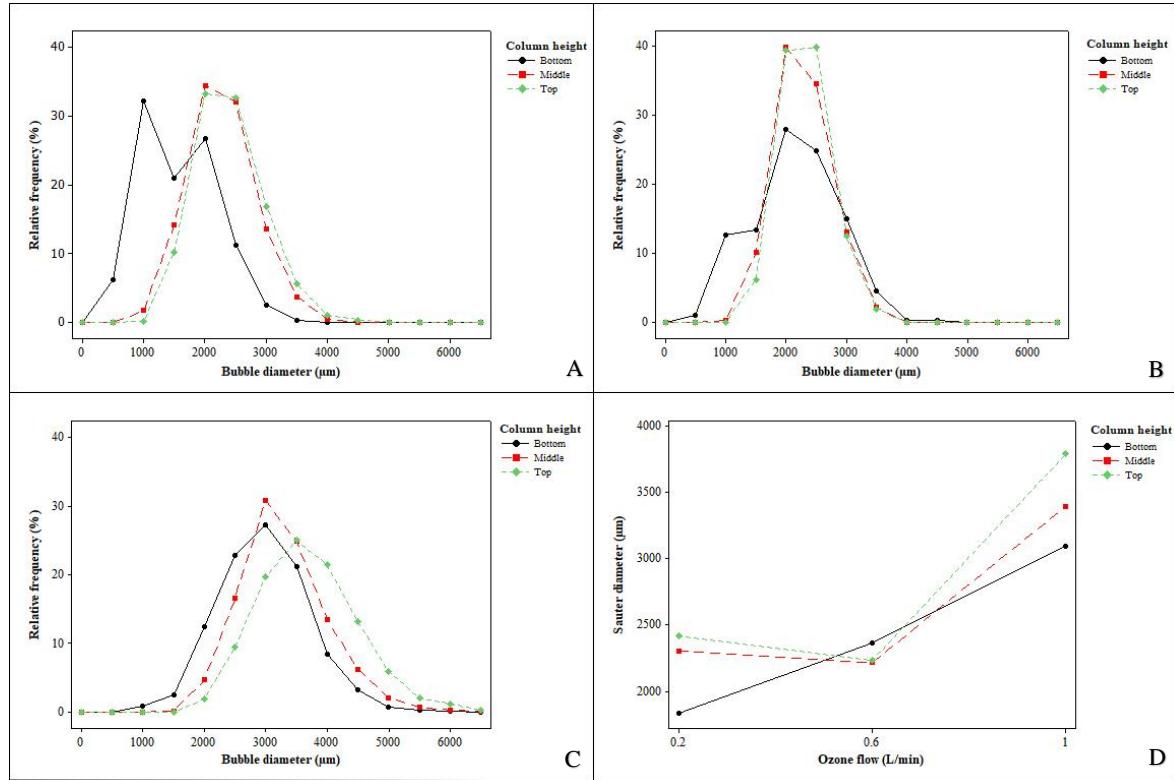


Fig. 4 The relative frequency of bubble size distribution and Sauter mean diameter (D) in three heights in the column (bottom, middle and top) with ozone flows of 0.2 (A), 0.6 (B) and 1 L/min (C) in triplicate measured 900 bubbles.

With a flow of 0.6 L/min the distribution was more homogeneous. The majority of the bubbles were concentrated between 1500 and 3000  $\mu\text{m}$  (representing 81, 97.6 and 98 % of the distribution, respectively). The distribution was maintained in the middle through the top of the column with a flow of 0.2 L/min with a Sauter diameter of 2045  $\mu\text{m}$  for the bottom, 2028  $\mu\text{m}$  at the middle and 3057  $\mu\text{m}$  at the top (Fig. 4d).

For the flow rate of 1 L/min the minimum diameter of the bubbles was not between 500 and 1000  $\mu\text{m}$  as it was for the other flow rates, and in fact bubbles with a diameter less than 1500  $\mu\text{m}$  were only in the lower part of the column. A significant size increase was found and the distribution is wider for the curves (Fig. 4c) for bubbles from 1500 to 5000  $\mu\text{m}$ . The highest frequency of bubbles (Fig. 4c) was between 3000 and 4000  $\mu\text{m}$  (56.9% bottom, 69% middle and 66% top). In contrast to other flows (0.2 and 0.6 L/min) the bubbles reach a diameter up to 6500  $\mu\text{m}$  with Sauter diameters 2146, 2071 and 3426  $\mu\text{m}$  for the bottom, middle and top, respectively.

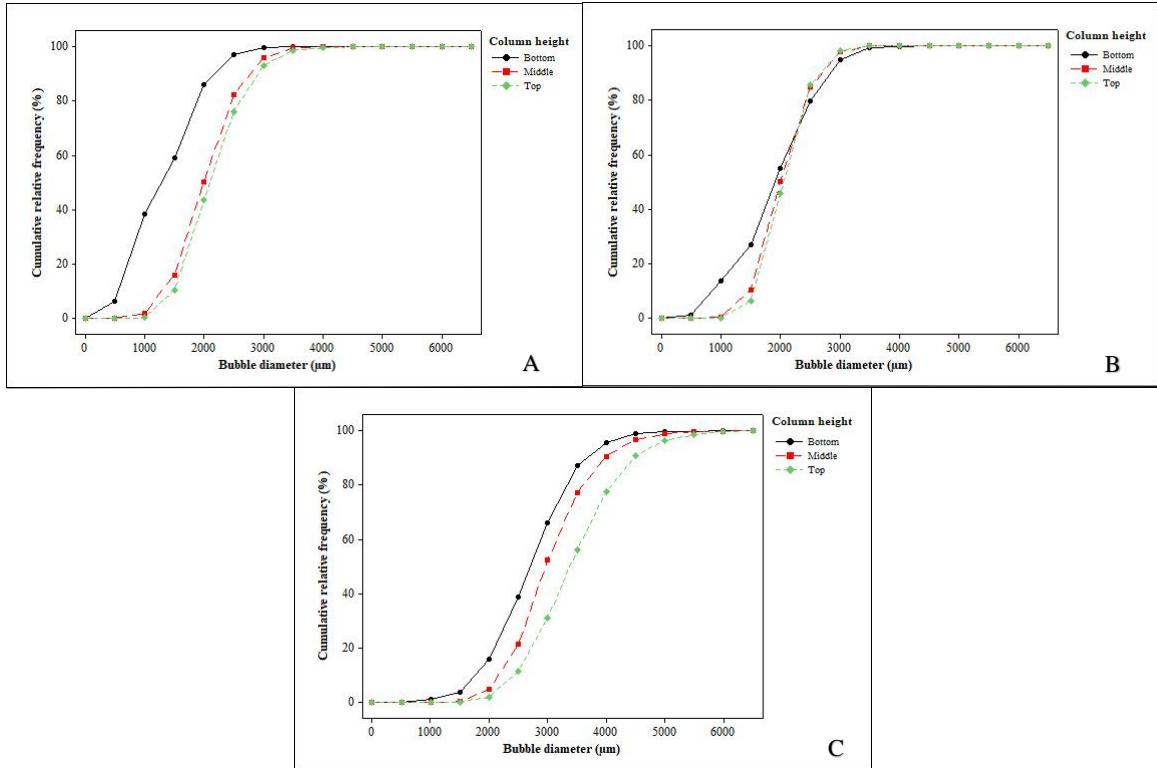


Fig. 5 The cumulative relative frequency of bubble size distribution in three heights in the column with ozone flows 0.2 (A), 0.6 (B) and 1 L/min (C) in triplicate measured 900 bubbles.

In figure 5a, the ozone flow of 0.2 L/min shows the smallest bubble sizes and the largest difference between the heights (bottom, middle and top) in the column with a maximum diameter of 3500  $\mu\text{m}$ , compared to the highest evaluated flows (0.6 and 1 L/min). For the flow of 0.2 L/min in the lower part of the column, 59% of the bubbles are below 1500  $\mu\text{m}$ , with 50% of the bubbles in the middle and 43.5% in the top at 2000  $\mu\text{m}$ . Already for the flow of 0.6 L/min (Fig. 4b) the relative cumulative frequency did not show much difference between heights; 55% of the bubbles range in the size up to 2000  $\mu\text{m}$  and for the mean, 50.2% and 45.7% for the middle and top, respectively, however the cumulative relative frequency that was more concentrated up to 1500  $\mu\text{m}$  for the flow of 0.2 L/min passed at 2000  $\mu\text{m}$ . For the flow of 1 L/min (Fig. 5c) the cumulative relative frequency increases, most are concentrated between 2500 and 4500  $\mu\text{m}$ , being 87% bottom, 77% middle and 56% top of the concentrated bubbles up to 3500  $\mu\text{m}$ .

### Microalgae harvest

Ozone flow rate had a great influence on harvested biomass and biomass oxidation during the ozone-flotation process. Figure 6 shows that the O<sub>3</sub> flow rate of 0.6 L/min was the most favorable and obtained the greatest harvest and oxidation of biomass.

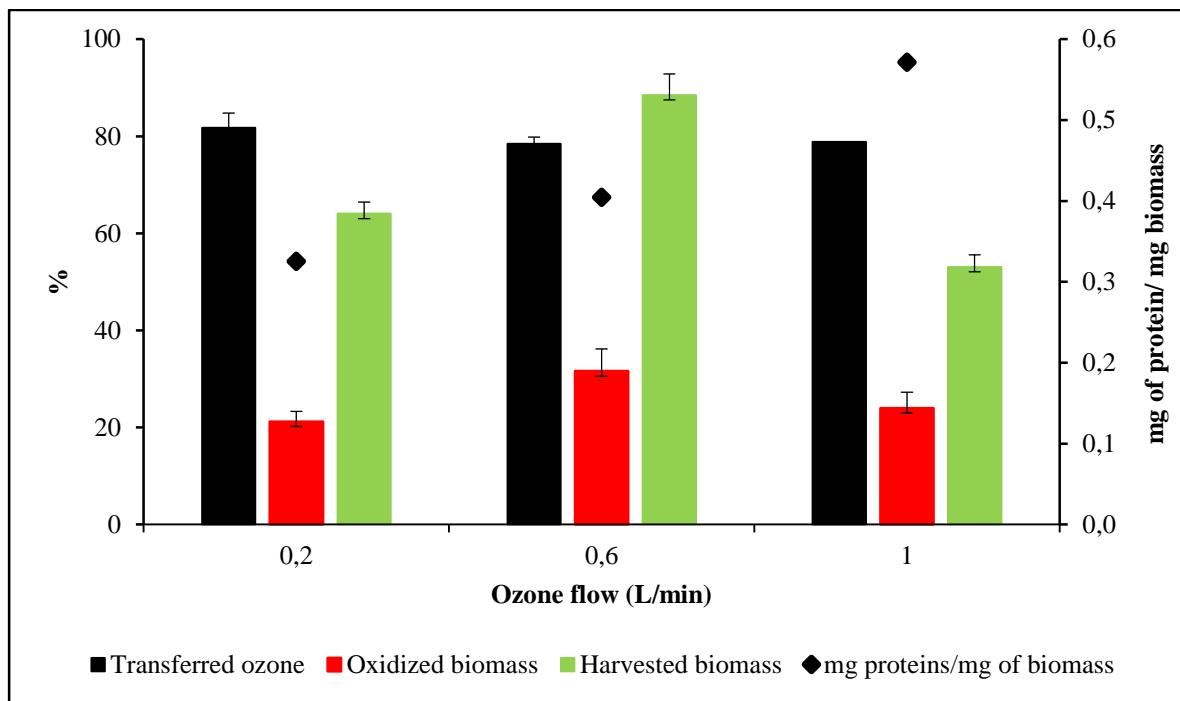


Fig. 6 Percentage of transferred O<sub>3</sub>, oxidized biomass and biomass harvested in relation to ozone flow, and determination of proteins in biomass (SD < 0.08).

The transferred O<sub>3</sub> had no significant difference for ozone flow (p-value 0.146), as opposed to oxidized biomass (p-value 0.006), harvested biomass (p-value 0.000) and proteins in harvested biomass (p-value 0.000). The effect of O<sub>3</sub> flow on biomass produced the best results for the flow of 0.6 L/min with 88.5% efficiency of ozone transfer and 31.6% of the initial biomass was oxidized by ozone; the oxidation variation in relation to the flow was 21.2% and 31.6 % for the flow of 0.2 and 0.6 L/min, respectively. The oxidation of biomass by ozone was demonstrated from the visualization of *Scenedesmus* sp. by microscope after ozonation (Fig. 7), which produced sizes smaller than 1 µm, with an average of  $0.93 \pm 0.19$  µm and was compared to the size of the initials cells that had a D<sub>90</sub> of  $3.57 \pm 0.008$  µm and an average diameter of  $2.2 \pm 0.03$  µm. *Scenedesmus* sp. have an approximated size of 6 to 20 x 3 to 10 µm, its morphology is unicellular as well as coenobia of 2, 4 and 8 cells [35,36].

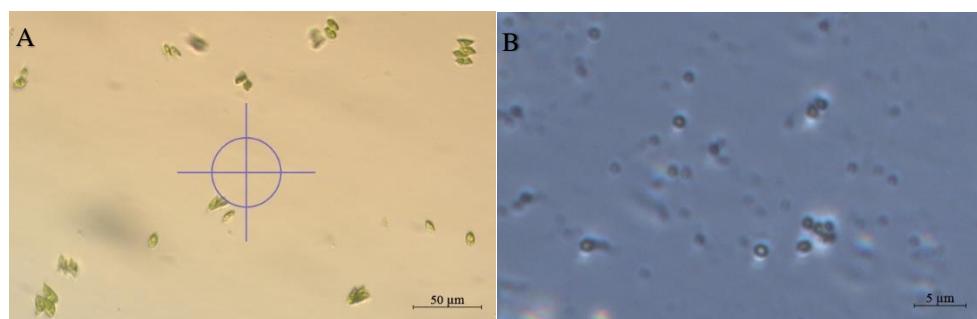


Fig. 7 Cells of *Scenedesmus* sp. before the application of ozone flotation with 40x magnification (A) and after application with a flow of 0.6 L/min 100x magnification (B).

The lowest efficiency was found when the O<sub>3</sub> flow was applied at 1 L/min, with an efficiency of 53%, 35.5% lower than the higher efficiency (88.5%). However for the proteins in the biomass harvested, the flow of 1 L/min was more efficient with  $0.57 \pm 0.03$  mg of proteins/mg of biomass, approximately 30% higher than when using a flow of 0.6 L/min.

The initial zeta potential of the microalgae was  $-15 \pm 1.4$  mV and a pH of about 8. After the ozone-flotation process, the zeta potential was different for each O<sub>3</sub> flow evaluated (Fig. 8).

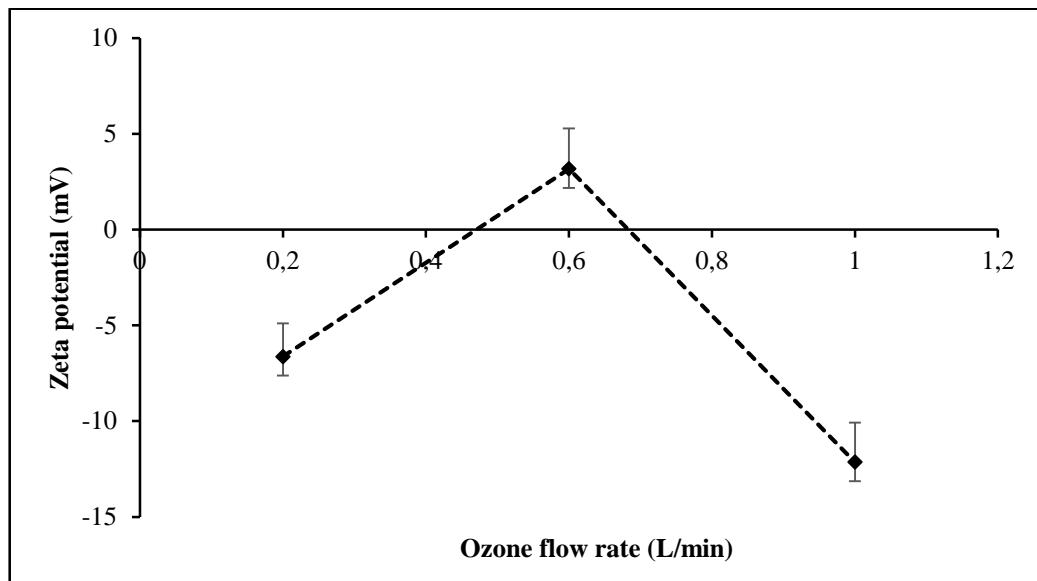


Fig. 8 Zeta potential after ozone-flotation.

For ozone flows of 0.2 and 1 L/min the microalgal loads after ozonation remained negative, but less negative than initially (-6.6 and -12.1 mV, respectively). For the flow of 0.6 L/min the charge of the microalgae was positive (3.17 mV).

## Discussion

### Ozone bubble size distribution and protein release in ozone-flotation

The photographic methods in combination with digital imaging is apparently a promising solution to obtain reliable measurements of bubble size in three-phase systems [37]. The fragile structure of the ozone bubbles present in flotation columns and the possibility of agglutination and dissolution are the main causes of deformation of the results when intrusive or *offline* (extraction of samples) methods are applied. In this study, the direct image capture method (*online*) was used in the real time flotation column, without the extraction of bubbles. However in the work of Reis and Barrozo [24] the same trends were obtained for the results using the *offline* and *online* method.

The size of the bubble increases with increasing ozone flow due to the larger volume of gas entering the system, this increase was also observed by Reis and Barrozo [24]. ]." Increased superficial gas velocity increases the bubble collision frequency leading to a higher coalescence rate and an increased stable bubble diameter [38].

For the ozone flow of 0.6 L/min, there was no significant difference in bubble size at the 3 heights of the column evaluated, probably due to higher protein extraction, which, unlike the other flows (0.2 and 1 L/min), showed an increase (54.7% for the O<sub>3</sub> flow of 0.2 L/min and 46.8% for 1 L/min). The proteins released by the microalgae exhibit surfactant activity, thus reducing the surface tension of bubbles and avoiding coalescence [39].

Each ozone flow and each column height produced significantly different Sauter mean diameters, with smaller diameters at the bottom that increased to the top. Bubbles carrying particles can be brought together in a turbulent vortex resulting in bubble coalescence and consequent detachment of particles. Inertial detachments have also been found, due to rapid changes in the trajectory of the bubble, or because of oscillations of the bubble's surface [12].

Through visual observations, it was observed that at the beginning of the ozone flotation process, the bubbles were less uniform and greater coalescence could be observed. With the passage of time and greater reaction of the ozone with the microalgae cells, the bubbles became uniform with less coalescence. However, at the end of the process the bubbles return to as they were in the beginning of the process due to the low concentration of microalgae and a consequent a reduction in proteins. In this case the application of ozone oxidizes the cells, releasing proteins that act as biosurfactants, reducing the superficial charge of the cells and avoiding the coalescence of bubbles, in addition to increasing the extraction of biomolecules due to their oxidizing action.

## **Microalgal harvesting**

In microalgae harvesting two processes predominate, the chemical reaction of ozone with microalgae and a physical process that favor the flotation of microalgae. Small bubbles increase the chance of bubble-particle contact, but very small bubbles have a low rate of ascent. Very large bubbles are also not favorable because they decrease bubble-particle interaction. Coward et al. [14] described the mechanism of bubble formation as a function of bubble size and elevation velocity as a key feature that significantly affects the efficiency of harvesting microalgae.

In this process, a biomass harvesting efficiency of up to 88.5% and 0.404 ± 0.08 mg of proteins/mg of biomass was obtained for an ozone flow of 0.6 L/min and doses of ozone applied at 0.16 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass. Valeriano-González et al. [39] with 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass and ozone flow 0.2 L/min obtained a lower efficiency (75%), for a lower concentration of microalgae (400 mg/L) and Oliveira et al. [40] obtained a biomass recovery of 62% and 0.58 mg of proteins/mg of biomass. The highest release of proteins obtained by the authors was due to the higher concentration of initial biomass (800 mg/L and 1200 mg/L), using the same species of microalgae (*Scenedesmus* sp.) and 0.14 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass. Velasquez-Orta et al. [41] obtained a biomass recovery of 79%, using higher doses of ozone (0.23 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass) and lower microalgal concentration (420 mg SST/L) than in this study (0.16 mg O<sub>3</sub>/mg of dry biomass and a 500 mg SST /L biomass concentration).

It was observed that efficiency is dependent on the flow of ozone applied. For the flow of 1 L/min it was not possible to obtain high efficiency due to shorter contact time and larger size of bubbles. For the flow of 0.2 L/min, the low efficiency was previously explained by low bubble flotation velocity and thus particle detachment, which may also be related to the negative zeta potential of the microalgae. However, for the flow of 0.6 L/min, there was a low stability of colloids with positive zeta potential (+3.2), which favored the high efficiency of microalgae harvest (88.5%) and oxidation of cells (31.6%) reducing its size to less than 1 μm. The increase in zeta

potential at 0.6 L/min flow rate, It occurred because there is more efficient contact between the bubbles and the particles, when there is a more homogeneous bubble size in the column and so highest microalgae harvesting (shown in Fig. 6), where the proteins may change the microalgae surface charge into slightly positive. Proteins are amphiphilic molecules that reduce surface tension and promote foaming [42], allowing microalgae harvesting and change in zeta potential. The decrease in algal size could be a result of disintegration of EOM from algal surface [43] or generation of algal debris due to cell lysis [44]. According to Tsang et al. [45] the contact time between the bubble and the particle depends on the flow rate of the gas, the higher the flow the shorter the contact time, and they demonstrated that coalescence behavior is independent of time of contact. Besides observing that for the flows of 0.2 and 1 L/min there was lower efficiency and greater coalescence of ozone bubbles, according to Ata [46], the particles detached from the bubble surfaces as a result of the oscillations caused by coalescence.

## Conclusions

Ozone-flotation bubble size distribution is one of the main characteristics that influences harvesting efficiency. For the flow of 0.2 L/min in the lower part of the column, 59% of the bubbles are below 1500 µm, with 50% of the bubbles in the middle and 43.5% in the top at 2000 µm. For the flow of 0.6 L/min the relative cumulative frequency did not show much difference between heights, 55% of the bubbles are below 2000 µm (bottom), 50.2% (middle) 45.7% (top). And for the flow of 1 L/min the size of the bubbles increases, being that the most are concentrated between 2500 and 4500 µm for the 3 columns height. The ozone flow of 0.6 L/min produced the most effective algal harvesting, liberation of proteins in the flotation column, biomass oxidation, greater destabilization of particles, and especially greater action of proteins as biosurfactant that reduce the coalescence of ozone bubbles for a biomass concentration of 500 mg/L of microalgae grown in wastewater.

## Acknowledgements

The authors acknowledge MSc. Isaura Yáñez-Noguez for her laboratory support and thanks to MEng. Calina Grazielli for her support with the figure of the experimental structure. This research project was supported by the Fondo Sectorial de Sustentabilidad Energética CONACYT-SENER, project 220704.

## References

- [1] C. Xin, M.M. Addy, J. Zhao, Y. Cheng, S. Cheng, D. Mu, Y. Liu, R. Ding, P. Chen, R. Ruan, Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study, *Bioresour. Technol.* 211 (2016) 584–593. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.102.
- [2] V.G. Gude, Wastewater treatment in microbial fuel cells - An overview, *J. Clean. Prod.* 122 (2016) 287–307. doi:10.1016/j.jclepro.2016.02.022.
- [3] J.I. Labb  , J.L. Ramos-Suárez, A. Hernández-Pérez, A. Baeza, F. Hansen, Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation, *J. Environ. Chem. Eng.* 5 (2017) 635–643. doi:10.1016/j.jece.2016.12.040.
- [4] H. Qari, M. Rehan, A.S. Nizami, Key Issues in Microalgae Biofuels: A Short Review, *Energy Procedia*.

- 142 (2017) 898–903. doi:10.1016/j.egypro.2017.12.144.
- [5] M.L. Gerardo, S. Van Den Hende, H. Vervaeren, T. Coward, S.C. Skill, Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants, *Algal Res.* 11 (2015) 248–262. doi:10.1016/j.algal.2015.06.019.
- [6] Y.S. Cho, J.S. Laskowski, Effect of flotation frothers on bubble size and foam stability, *Int. J. Miner. Process.* 64 (2002) 69–80. doi:10.1016/S0301-7516(01)00064-3.
- [7] N. Uzman, Y. Qi, M.K. Danquah, G.M. Forde, A. Hoadley, Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels, *J. Renew. Sustain. Energy.* 2 (2010). doi:10.1063/1.3294480.
- [8] D. Vandamme, I. Fouquet, K. Muylaert, Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 233–239. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.005.
- [9] S.B. Ummalyma, A.K. Mathew, A. Pandey, R.K. Sukumaran, Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation, *Bioresour. Technol.* 213 (2016) 216–221. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.114.
- [10] N. Betzer, Y. Argaman, Y. Kott, Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation, *Water Res.* 14 (1980) 1003–1009. doi:10.1016/0043-1354(80)90144-X.
- [11] A. Hassanzadeh, B.V. Hassas, S. Kouachi, Z. Brabcova, M.S. Çelik, Effect of bubble size and velocity on collision efficiency in chalcopyrite flotation, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 498 (2016) 258–267. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.03.035.
- [12] G. Wang, G.M. Evans, G.J. Jameson, Bubble movement in a rotating eddy : The implications for particle-bubble detachment, *Chem. Eng. Sci.* 161 (2017) 329–340. doi:10.1016/j.ces.2016.12.034.
- [13] C.H. Wong, M.M. Hossain, C.E. Davies, Performance of a continuous foam separation column as a function of process variables, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 24 (2001) 73–81. doi:10.1007/s004490100225.
- [14] T. Coward, J.G.M. Lee, G.S. Caldwell, The effect of bubble size on the efficiency and economics of harvesting microalgae by foam flotation, *J. Appl. Phycol.* 27 (2015) 733–742. doi:10.1007/s10811-014-0384-5.
- [15] Z. Brabcová, T. Karapantsios, M. Kostoglou, P. Basařová, K. Matis, Bubble-particle collision interaction in flotation systems, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 473 (2014) 95–103. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.11.040.
- [16] J. Ralston, D. Fornasiero, R. Hayes, Bubble – particle attachment and detachment in flotation, (1999) 133–164.
- [17] R. Maxwell, S. Ata, E.J. Wanless, R. Moreno-Atanasio, Computer simulations of particle-bubble interactions and particle sliding using Discrete Element Method, *J. Colloid Interface Sci.* 381 (2012) 1–10. doi:10.1016/j.jcis.2012.05.021.
- [18] Y. Xing, X. Gui, Y. Cao, Effect of bubble size on bubble-particle attachment and film drainage kinetics - A theoretical study, *Powder Technol.* 322 (2017) 140–146. doi:10.1016/j.powtec.2017.09.007.
- [19] V. Sarrot, P. Guiraud, D. Legendre, Determination of the collision frequency between bubbles and particles in flotation, *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 6107–6117. doi:10.1016/j.ces.2005.02.018.
- [20] A.V. Nguyen, H.J. Schulze, J. Ralston, Elementary steps in particle—bubble attachment, *Int. J. Miner. Process.* 51 (1997) 183–195. doi:10.1016/S0301-7516(97)00030-6.
- [21] C.M. Phan, A. V. Nguyen, J.D. Miller, G.M. Evans, G.J. Jameson, Investigations of bubble-particle

- interactions, *Int. J. Miner. Process.* 72 (2003) 239–254. doi:10.1016/S0301-7516(03)00102-9.
- [22] R.T. Rodrigues, J. Rubio, New basis for measuring the size distribution of bubbles, *Miner. Eng.* 16 (2003) 757–765. doi:10.1016/S0892-6875(03)00181-X.
- [23] J. Hanotu, H.C.H. Bandulasena, W.B. Zimmerman, Microflotation performance for algal separation, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1663–1673. doi:10.1002/bit.24449.
- [24] A.S. Reis, M.A.S. Barrozo, A study on bubble formation and its relation with the performance of apatite flotation, *Sep. Purif. Technol.* 161 (2016) 112–120. doi:10.1016/j.seppur.2016.01.038.
- [25] Y.L. Cheng, Y.C. Juang, G.Y. Liao, P.W. Tsai, S.H. Ho, K.L. Yeh, C.Y. Chen, J.S. Chang, J.C. Liu, W.M. Chen, D.J. Lee, Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 82–87. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.083.
- [26] R.A. Grau, K. Heiskanen, Bubble size distribution in laboratory scale flotation cells, *Miner. Eng.* 18 (2005) 1164–1172. doi:10.1016/j.mineng.2005.06.011.
- [27] A. Vazirizadeh, J. Bouchard, Y. Chen, Effect of particles on bubble size distribution and gas hold-up in column flotation, *Int. J. Miner. Process.* 157 (2016) 163–173. doi:10.1016/j.minpro.2016.10.005.
- [28] C. Wu, L. Wang, D. Harbottle, J. Masliyah, Z. Xu, Studying bubble-particle interactions by zeta potential distribution analysis, *J. Colloid Interface Sci.* 449 (2015) 399–408. doi:10.1016/j.jcis.2015.01.040.
- [29] Z. Chen, S. Ata, G.J. Jameson, Behaviour of bubble clusters in a turbulent flotation cell, *Powder Technol.* 269 (2015) 337–344. doi:10.1016/j.powtec.2014.09.025.
- [30] M.H. Chegeni, M. Abdollahy, M.R. Khalesi, Bubble loading measurement in a continuous flotation column, *Miner. Eng.* 85 (2016) 49–54. doi:10.1016/j.mineng.2015.08.010.
- [31] C.E. Cilek, S. Karaca, Effect of nanoparticles on froth stability and bubble size distribution in flotation, *Int. J. Miner. Process.* 138 (2015) 6–14. doi:10.1016/j.minpro.2015.03.004.
- [32] D. Beneventi, F. Almeida, N. Marlin, D. Curti, L. Salgueiro, M. Aurousseau, Hydrodynamics and recovered papers deinking in an ozone flotation column, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 48 (2009) 1517–1526. doi:10.1016/j.cep.2009.10.007.
- [33] C.. Birdsall, A.C. Jenkins, E. Spadiner, Iodometric Determination of Ozone, *Anal. Chem.* 24 (1952) 662–664. doi:10.1021/ac60064a013.
- [34] A.G. Gornall, charles j. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177 (1948) 751–766.
- [35] F.J. Tavera, R. Escudero, J.A. Finch, Gas holdup in flotation columns: Laboratory measurements, *Int. J. Miner. Process.* 61 (2001) 23–40. doi:10.1016/S0301-7516(00)00026-0.
- [36] S.S. An, T. Friedl, E. Hegewald, Phylogenetic Relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like Coccoid Green Algae as Inferred from ITS-2 rDNA Sequence Comparisons, *Plant Biol.* 1 (1999) 418–428.
- [37] R.A. Grau, K. Heiskanen, Visual technique for measuring bubble size in flotation machines, *Miner. Eng.* 15 (2002) 507–513. doi:10.1016/S0892-6875(02)00074-2.
- [38] R. Schäfer, C. Merten, G. Eigenberger, Bubble size distributions in a bubble column reactor under industrial conditions, *Exp. Therm. Fluid Sci.* 26 (2002) 595–604. doi:10.1016/S0894-1777(02)00189-9.
- [39] M.T. Valeriano González, I. Monje-Ramírez, M.T. Orta Ledesma, J. Gracia Fadrique, S.B. Velásquez-

- Orta, Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction, *Biomass and Bioenergy*. 95 (2016) 109–115. doi:10.1016/j.biombioe.2016.09.020.
- [40] G.A. Oliveira, E. Carissimi, I. Monje-ramírez, S.B. Velasquez-orta, R.T. Rodrigues, M.T. Orta Ledesma, Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for *Scenedesmus* microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond, *Bioresour. Technol.* 259 (2018) 334–342. doi:10.1016/j.biortech.2018.03.072.
- [41] S.B. Velasquez-Orta, R. Garcia-Estrada, I. Monje-Ramirez, A. Harvey, M.T. Orta Ledesma, Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries, *Biomass and Bioenergy*. 70 (2014) 356–363. doi:10.1016/j.biombioe.2014.08.022.
- [42] C.N. Mulligan, Environmental applications for biosurfactants, *Environ. Pollut.* 133 (2005) 183–198. doi:10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- [43] S. Babel, S. Takizawa, Chemical pretreatment for reduction of membrane fouling caused by algae, *DES*. 274 (2011) 171–176. doi:10.1016/j.desal.2011.02.008.
- [44] M.T. Hung, J.C. Liu, Microfiltration for separation of green algae from water, 51 (2006) 157–164. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.07.003.
- [45] Y.H. Tsang, Y.H. Koh, D.L. Koch, Bubble-size dependence of the critical electrolyte concentration for inhibition of coalescence, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 290–297. doi:10.1016/j.jcis.2004.01.026.
- [46] S. Ata, *Journal of Colloid and Interface Science*, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 558–565. doi:10.1016/j.jcis.2009.07.003.

#### **4. Artigo 3 – Harvesting microalgae by ozone-flotation: influence of microalgae biomass concentration on bubble size distribution and separation efficiency**

*Gislayne Alves Oliveira<sup>†</sup>, Sharon B. Velasquez-Orta<sup>‡</sup>, Ignacio Monje-Ramirez<sup>§</sup>, Isaura Yañez Noguez<sup>§</sup>, Elvis Carissimi<sup>†</sup>, María Soledad Córdova Aguilar<sup>||</sup>, María Teresa Orta Ledesma<sup>\*,§</sup>*

<sup>†</sup> Departamento de Pós Graduação em Engenharia Civil, Centro de Tecnologias, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

<sup>‡</sup> School of Chemical Engineering and Advanced Materials, Newcastle University, Newcastle Upon Tyne NE1 7RU, England, UK

<sup>§</sup> Instituto de Ingeniería, Coordinación de Ingeniería Ambiental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CEP 04510, CDMX, México

<sup>||</sup> Ingeniería de Proceso, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CEP 04510, CDMX, México

**KEYWORDS:** Biomass concentration, bubble size, viscosity, *Scenedesmus obliquus*, wastewater, proteins.

#### **INTRODUCTION**

Sustainable energy production is one of the most important resources in the development of technologies, and a promising source is the use of microalgae as a feedstock. Algae are obtained in nature, do well in poor conditions, occupy little area for growth and replace the use of food products for the production of biofuel.

The main potential advantages compared to conventional plant cultures are: 1) the highest biomass productivity per unit area and time <sup>1</sup>; 2) non-competitiveness of land, for food and fiber production, since it can even be produced on non-arable land <sup>2</sup>; 3) improved water and nutrient economy through effective recycling <sup>3</sup>; 4) the possibility of using wastes from industries as a source of cheap nutrients, especially CO<sub>2</sub>, N and P, which can assist in the management of urban or industrial waste, help mitigate climate change and reduce the demand for fertilizers <sup>3</sup>.

Microalgae contain lipids and fatty acids as membrane components, storage products, metabolites and energy sources, and many can be induced to accumulate 2 to 40% lipids/oils in their mass <sup>4</sup>. Due to this great potential of accumulation of lipids and fatty acids some microalgae stand out for the production of biofuels.

Several microalgal harvesting techniques for the production of biofuels are being studied to reduce costs and increase the efficiency of harvesting and extraction of lipids and carbohydrates. An innovative method is ozone-flotation, which adds two treatment steps to the physical properties of flotation and to the oxidation properties of ozone. However, these studies are still limited. Ozone is used more for oxidation and disinfection in wastewater treatment <sup>5</sup>.

The first study of microalgal separation with induced ozone flotation was presented by Betzer et al.,<sup>6</sup> who obtained complete separation of microalgae without the addition of coagulants, leaving no residues in the water. Oliveira et al.,<sup>7</sup> obtained a large removal of nutrients from wastewater with *Scenedesmus* sp. and better biomolecule recovery by ozone-flotation when compared to coagulation-flocculation.

Valeriano González et al.,<sup>8</sup> showed that the release of microalgae proteins has surfactant effects that reduce the surface tension of the system (42 mN/m) and promote the

formation of foam and recovery of biomass. However, there are no publications that evaluate the effect of microalgal concentration on the size and distribution of bubbles. In general, ozone-flotation research is more focused on treatment and harvesting<sup>6-12</sup>; it does not evaluate bubble/particle interaction. It is of fundamental importance to understand this reaction since the bubbles perform a range of functions within the process.

In the interior of a liquid reservoir, bubble movement facilitates mixing and thus increases the likelihood of bubble/algae interaction<sup>13</sup>. The bubbles provide the interface for microalgal cell binding and transport the microalgae bound to the foam-liquid interface<sup>14</sup>, and the contact between ozone bubbles and microalgae cells will delimit the efficiency of harvesting and the release of biomolecules for the generation of biofuels.

In this context, this work aims to highlight, for the first time, the influence of the concentration of microalgae on the distribution and size of ozone bubbles, as well as evaluate this difference of concentration on the efficiency of the microalgae harvest process by ozone-flotation and its influence on rheological properties.

## MATERIALS AND METHODS

### **Microalgae cultivation in wastewater and a high rate algal pond (HRAP)**

The predominant microalgae used in this study were the species *Scenedesmus obliquus*, which were grown in wastewater collected from a municipal wastewater treatment plant in Mexico City. First the wastewater was filtered to remove the solids. After filtration, the microalgae were cultured in 15 liters of residual water and 15 liters of microalgae culture in a high rate algal pond with a capacity of 30 liters. They were kept under lighted conditions (photoperiod 24:0 - light:dark), controlled agitation (21.6 cm/s) with growth maintained for 14 days<sup>7</sup>. Biomass concentration (total suspended solids, TSS) was determined indirectly by gravimetry using standard methods (APHA, 2005). The biomass harvested was calculated by

dividing the harvested biomass and oxidized biomass by the initial biomass concentration; oxidized biomass was calculated from the initial biomass by subtracting the harvested biomass and biomass that remained in the flotation column.

### Evaluation of ozone-flotation for microalgae harvesting

Ozone-flotation experiments were conducted in batch using a skimmer-type reactor, coupled to a Labo 76 ozone generator (Emery Trailigaz, USA). The ozone was injected using a 10-15 µm pore size glass diffuser located at the bottom of the flotation column. For all experiments a 1 L culture of *Scenedesmus obliquus* and a dose of 0.16 mg O<sub>3</sub>/mg of dry biomass were used. The ozone concentration in the gas phase was determined using the Iodometric Method<sup>15</sup>. Different concentrations of microalgae biomass of 500, 700 and 1000 mg/L and O<sub>3</sub> flows of 0.2, 0.6 and 1 L/min were evaluated. For the experiments, a design with two factors was proposed that involved carrying out 18 experiments, each with two replicates. The response parameters were: bubble size, recovered and oxidized biomass, column proteins, shear viscosity and mass transfer of O<sub>3</sub>. Statistical analysis was performed using R software version 3.2.2. An analysis of variance (ANOVA) was applied at the 5% significance level, to analyze and compare the experimental data by Tukey test.

### Ozone bubble size determination

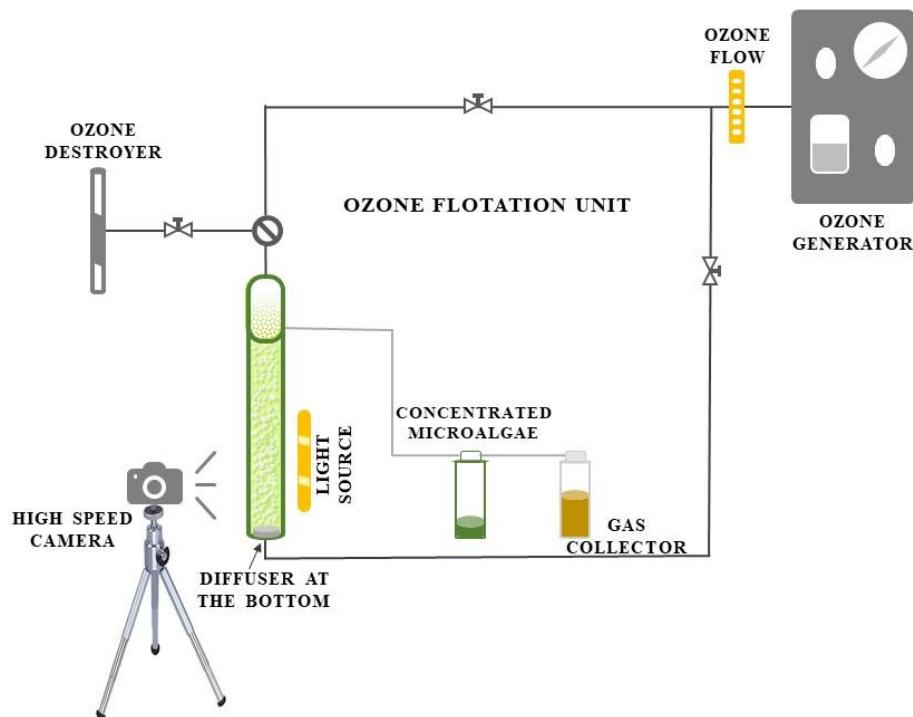
Bubbles generated in ozone-flotation were measured in a three-phase system (wastewater-ozone-microalgae) applying a visual technique with image analysis (Figure 1). The images were captured by a NIKON D3400 camera with an AF-S DX MICRO NIKKOR 400 MM lens. The flotation column was backlit using illumination and assisted using a cold light, with three vertically mounted Osram T8 10 W LED lamps.

The images were captured at 25 cm from the bottom of the column, after 5 minutes of ozone flotation in order to enable the ozone to react with the microalgae. A ruler was placed

inside the flotation column with the microalgae culture to calibrate the images by conversion to pixel number. This procedure was carried out for each initial biomass concentration and ozone flow. Free software for image data processing and analysis (*Image Tools*) was used. About 300 bubbles<sup>14,16</sup> were measured manually for determination of the size distribution in each experimental run. The mean bubble diameter adopted was the Sauter diameter, calculated by the equation:

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_{bi}^3}{\sum n_i d_{bi}^2}$$

where:  $d_{bi}$  is the bubble diameter and  $n_i$  is the number of bubbles.



**Figure 1.** Experimental setup used to determine bubble size distribution and harvesting of microalgae by ozone-flotation.

## Rheological properties

Shear viscosity tests were carried out from 0.1 to 1000 s<sup>-1</sup> in a stress-controlled Rheometer (MCR101, Anton Paar Physica, Austria) equipped with a cylinder concentric geometry (CC27/T200 AL). All measurements were made in duplicate at 25°C.

## Proteins

The total protein content was determined by the Biuret colorimetric method as described by Gornall et al.<sup>17</sup>. For “reactor protein”, the proteins that remained in the flotation column bulk liquid obtained after ozonation were measured. After filtration of the liquid remaining in the column, 1 ml of this water was used for the determination of proteins in the ozone-flotation column, and for measurement on a HACH spectrophotometer at a wavelength of 540 nm.

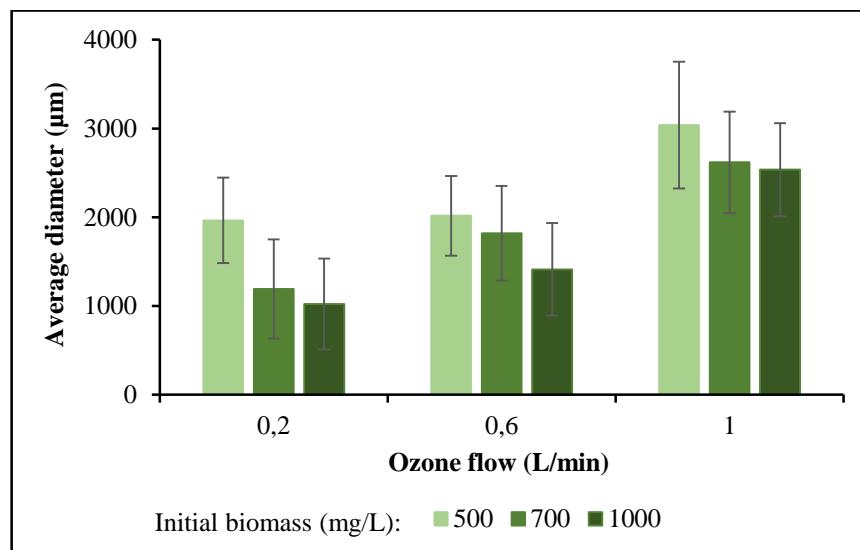
## RESULTS AND DISCUSSION

### Influence of microalgae biomass concentration on bubble size distribution

The increase in biomass concentration significantly influenced the size of ozone bubbles (p-value 0.000) in the system (Figure 2), regardless of the flow applied. The highest difference observed within ozone flows applied (0.2, 0.6 and 1 L/min) was in 0.2 L/min, where a biomass concentration of 500 mg/L had a mean bubble size of 1963 ± 482 µm; whereas for a concentration of 1000 mg/L the size was 1022 ± 511 µm. This difference between the sizes of ozone bubbles with respect to the concentration of microalgae is due to the ozone action in cells that causes a release of proteins acting as biosurfactants that reduce the size and coalescence of bubbles. During ozone-flotation, proteins released exhibited a surfactant activity in water by disrupting surface tension<sup>8</sup>.

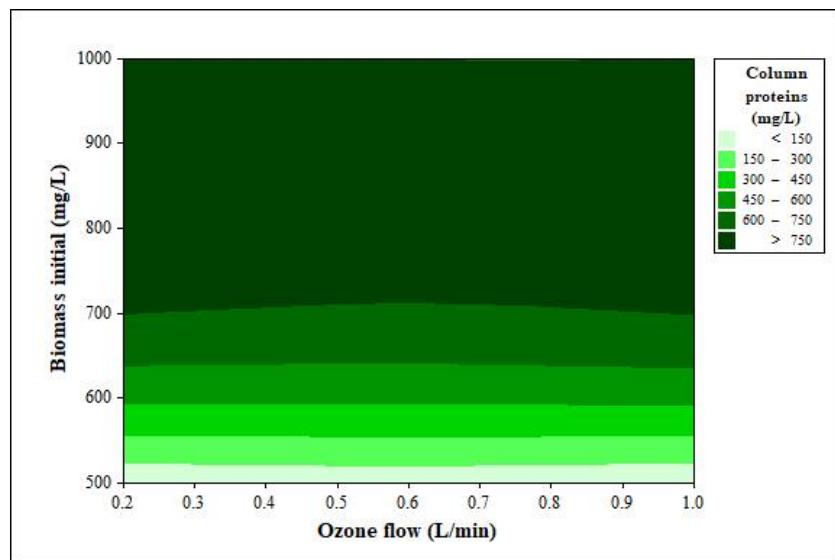
As the ozone flow increases (Figure 2), the difference between averages bubble sizes decreases, due to a coalescence effect predominating when bubbles exit the diffuser. In

addition, longer contact time spent in the ozone flotation chamber and mutual collisions increase the probability of coalescence. The mechanism of bubble formation is a key design feature that significantly affects harvest efficiency as a function of bubble size and rise velocity<sup>14</sup>.



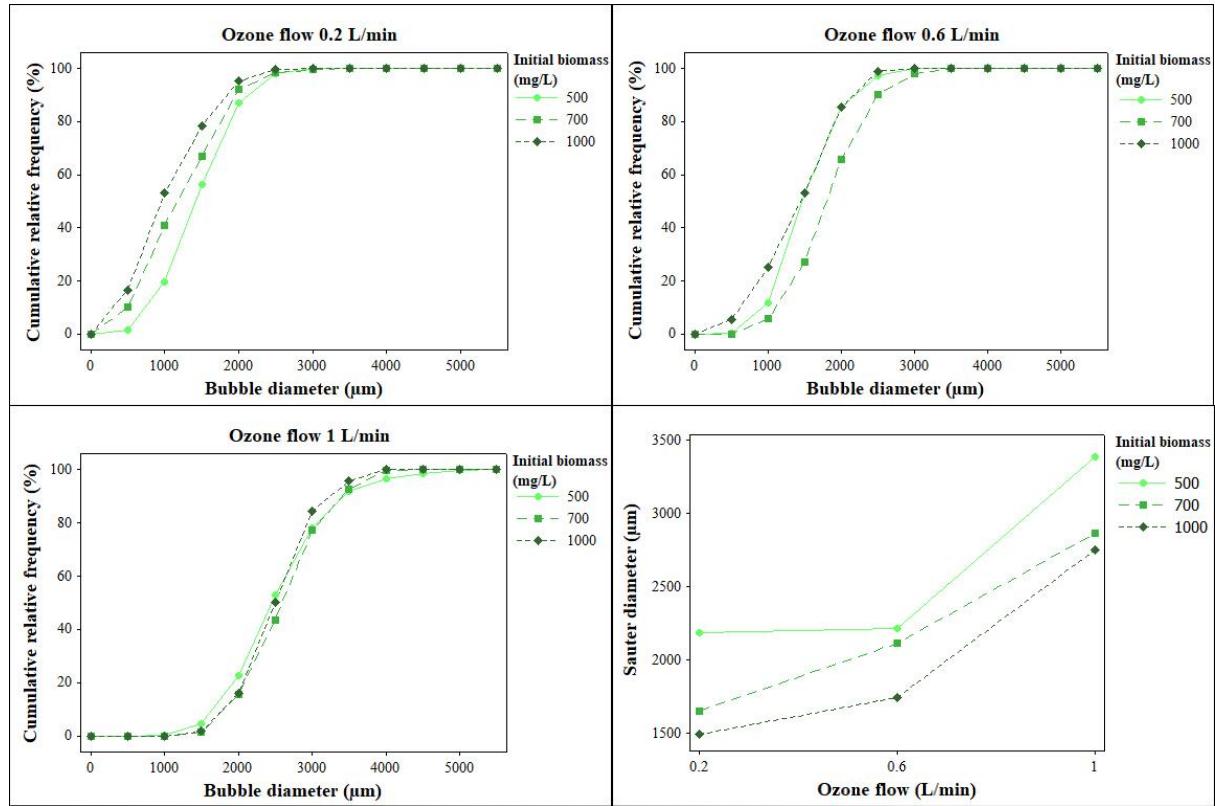
**Figure 2.** Average diameter of the ozone bubbles and standard deviation at three biomass concentrations and three ozone flows.

The increase in bubble size with the lowest concentration of microalga (500 mg/L) is directly related to the release of proteins in the column (*p*-value 0.000) where concentrations below 150 mg protein/L were observed. This is different from what occurs with a biomass concentration greater than 700 mg/L where the protein concentration in the column becomes greater than 750 mg/L. According to Valeriano González et al.,<sup>8</sup> a critical micelle concentration (CMC) of at least  $550 \pm 17$  mg protein/L was needed to produce foaming and biomass separation of the aqueous medium. Typically, the more efficiently the surfactant adsorbed at the bubble interface<sup>18</sup>, the efficiency of harvesting microalgae improves.



**Figure 3.** Release of proteins in the ozone-flotation column with different concentrations of *Scenedesmus obliquus*.

The cumulative relative bubble diameter frequency curves (Figure 4) were similar when a constant ozone flow was applied at different concentrations of biomass. The greatest difference occurred for the flow of 0.2 L/min where a greater variation in the distribution of the bubbles was obtained than for 0.6 and 1 L/min flows. At 0.2 L/min, the frequency ranged from 56.5% (biomass concentration of 500 mg/L) to 78.3% (1000 mg/L) for bubbles sizes up to 1500  $\mu$ . At this flow, a greater number of small bubbles were present at high concentrations of microalgae, and consequently a higher concentration of proteins released into the column.



**Figure 4.** Cumulative relative frequency for three ozone flows and three initial biomass concentrations.

For the ozone flow of 0.6 L/min the distribution curve presented the greatest similarity when using biomass concentrations of 500 and 1000 mg/L; both contained approximately 85% of bubbles with a size up to 2000 μm, as opposed to the concentration of 700 mg/L which contained 66%. For the ozone flow of 1 L/min, the size of bubbles increased considerably, up to 5000 μm. Bubbles up to 2500 μm were concentrated at 53%, 44% and 50% for biomasses of 500, 700 and 1000 mg/L, respectively.

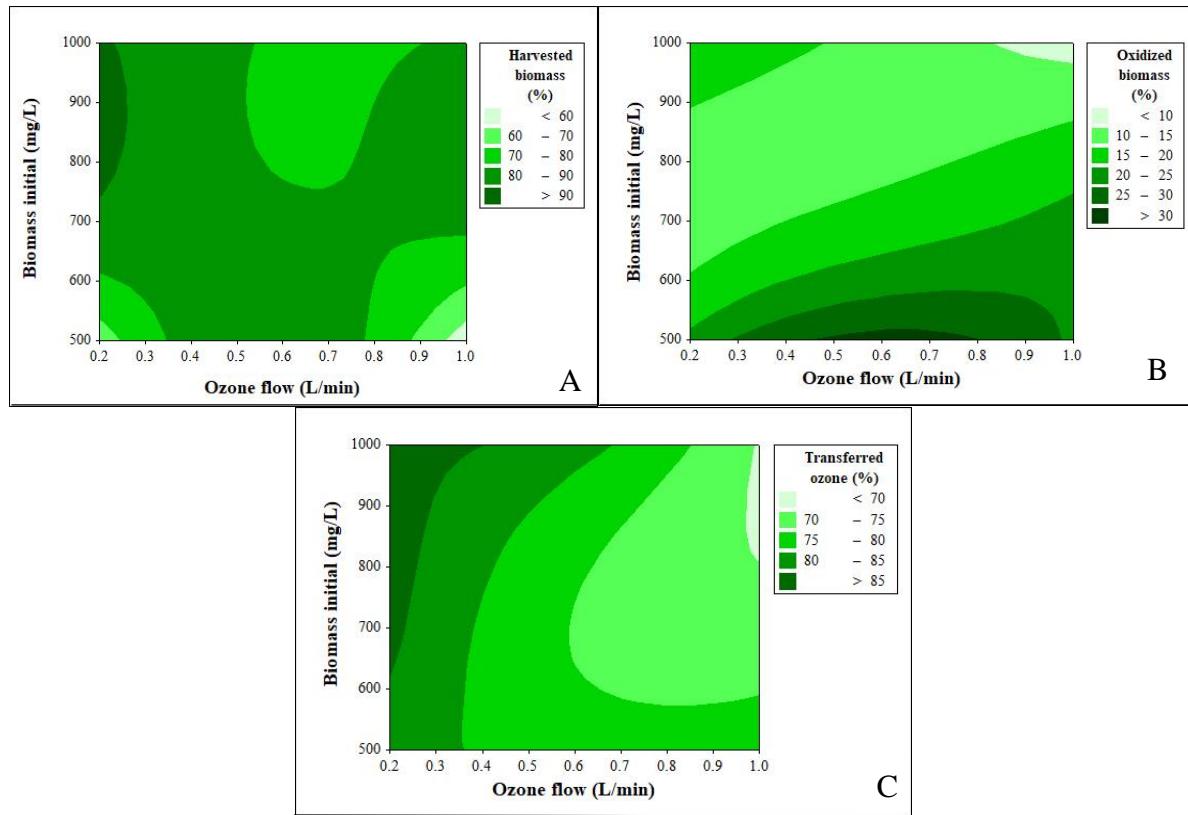
For all ozone flows (0.2, 0.6 and 1 L/min) the lowest Sauter diameters were obtained when using the highest biomass concentration (1000 mg/L), as expected. The size of the Sauter diameter was maximum when using the lowest concentration of biomass and greatest ozone flow. The addition of surfactants reduced bubble coalescence and pushed bubbles in the

slurry zone toward the foam phase, due to an increase in the residence time of air bubbles<sup>19</sup>.

### **Effect of initial biomass and ozone flow in separation efficiency**

Figure 5 shows the results of the harvested biomass, oxidized biomass and transferred ozone during ozone-flotation. A high biomass recovery efficiency was obtained (92%), as well as an ozone transfer from 70% to 86%, with a 10% to 32% of oxidized biomass, when using 0.16 mg O<sub>3</sub>/mg of biomass.

The ozone flow significantly affected the ozone transferred (p-value 0.0000258), as opposed to the biomass harvested. The amount of oxidized biomass was positively influenced by the initial biomass concentration (p-value 0.0015 and 0.0000866, respectively). As shown in Figure 5A, the maximum harvested biomass was >90% with a flow lower than 0.3 L/min and a biomass concentration higher than 730 mg/L. Here, the chemical oxidation effect of ozone dominated, due to an increased ozone transfer (Figure 5C). The transfer of ozone for small flows (0.2 L/min) related to the size of the bubbles (Figure 2), an increased amount of small bubbles improved the contact surface area when compared to large bubbles (considering the same ozone volume). This enabled an improved contact and interaction with the microalgae. Particularly, when the concentration of microalgae was greater than 700 mg/L, the probability of bubble/particle collision increased, thus increasing the ozone transfer. The small bubbles produced in the liquid pool increased the collision rate and attachment efficiency<sup>14</sup>, rising algae capture prior to reaching the liquid surface<sup>20</sup>.



**Figure 5.** Effect of initial biomass and ozone flow: A. harvested biomass, B. oxidized biomass, and C. transferred ozone.

Only for the 1 L/min flow and the biomass concentration of 500 mg/L, the biomass recovery was lower than 60%. The highest biomass oxidation rates (Figure 5B) were obtained for an initial biomass of 500 mg/L (20 to 31.6%), independent of ozone flow (*p*-value 0.27). Due to the low concentration of microalgae and the increase in the size of the bubbles, the bubble/particle contact is reduced which decreases the harvesting efficiency. The decrease observed at different bubble/particle ratios is greater than optimum and indicates that when cell concentrations are more dilute relative to bubble concentration, removal is reduced as the probability of bubble-particle collision is lowered<sup>18</sup>. Higher concentration of biomass increased the harvesting efficiency (80-90 %). Within the rising foam phase, larger bubbles are correlated to an increase in foam drainage<sup>21</sup>, which improved biomass concentrations per

liter harvested<sup>14</sup>.

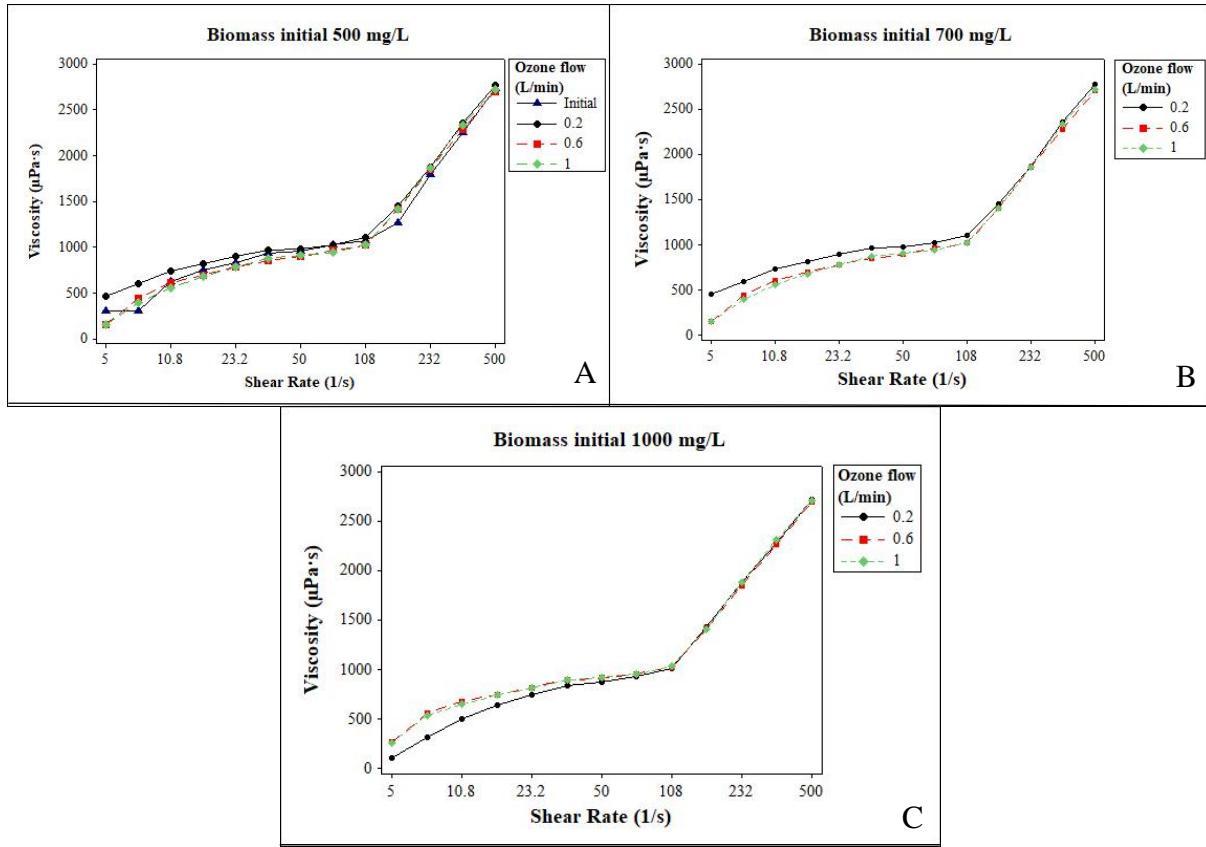
According to the Tukey analysis, for an initial biomass of 500 mg/L, a harvesting efficiency of 89% was obtained with a flow of 0.6 L/min. For 700 and 1000 mg/L, the best flow was 0.2 L/min with efficiencies of 88 and 92% respectively. No differences were found between the initial biomasses (700 and 1000 mg/L). The largest ozone mass transfer (86%) was achieved with a biomass greater than 620 mg/L and a flow of 0.2 – 0.35 L/min, but it did not differ statistically from the other flows, except when the flow of 1 L/min for the biomass of 1000 mg/L (69.5% O<sub>3</sub> transfer) was applied.

The results of this study compared with those published by other authors are shown in Table 1. Cheng et al.,<sup>12,22</sup> reported a high reduction in turbidity between 95 and 98%, using a high dose of ozone, a different culture medium and strains. Here wastewater was used to decrease the microalgae growing cost and also to use microalgae as a source of treatment, as previous satisfactory results have been presented<sup>7</sup>. The low efficiencies obtained by Velasquez Orta et al.,<sup>11</sup> and Valeriano González et al.,<sup>8</sup> were probably due to the difference in species of microalgae as well as the water coming from freshly treated wastewater and an artificial lake, along with the differences in applied ozone concentrations. Different results were also found using the same microalgae species, but with different ozone doses<sup>7,9</sup>.

**Table 1.** Ozone-flotation conditions used by different studies for the harvesting of microalgal biomass.

| Microalgae species                | Culture medium           | Microalgae concentration (mg/L) | mg O <sub>3</sub> / mg biomass | Biomass recovery (%)    | Reference  |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i>         | pure culture             | -                               | 0.2 - 0.5                      | Turbidity reduction 98% | 22         |
| <i>Scenedesmus obliquus</i> FSP-3 | modified Detmer's        | -                               | 0.2 - 0.5                      | Turbidity reduction 95% | 12         |
| Mixed microalgae                  | fresh treated wastewater | 420                             | 0.23                           | 79.6                    | 11         |
| Consortium microalgae             | artificial lake          | 400                             | 0.14                           | 75                      | 8          |
| <i>Scenedesmus</i> sp.            | Wastewater               | 300, 500 and 700                | 0.05 - 0.142                   | 70-75                   | 9          |
| <i>Scenedesmus</i> sp.            | Wastewater               | 800 and 1200                    | 0.14                           | 62                      | 7          |
| <i>Scenedesmus obliquus</i>       | Wastewater               | 500, 700 and 1000               | 0.16                           | 89-92                   | This study |

The rheological properties of water submitted to different initial biomass concentration and ozone flows were studied after being harvested by ozone-flotation. For all the samples tested, viscosity had the same behavior (Figure 6). Moreover, the viscosities suggest that no viscous substances such as extracellular polysaccharides were excreted by the species<sup>23</sup> after ozone-flotation. Only for the flow of 0.2 L/min with an initial biomass of 700 mg/L and for the flows of 0.6 and 1 L/min with an initial biomass of 1000 mg/L, was there a small increase in viscosity at the beginning of the shear rate (Figures 6B, C). This is normally an effect produced by the release of polysaccharides, which can cause a sharp increase in medium viscosity<sup>24</sup>. Additionally, data of solutions after the algae had been harvested were monitored and compared with viscosity data of the culture medium and no differences were found in viscosities before or after treatment (data not shown).



**Figure 6.** Viscosity of water after harvesting of microalgae by ozone flotation with different initial biomasses (A: 500 mg/L; B: 700 mg/L and C: 1000 mg/L) and ozone flows as a function of shear rate.

## CONCLUSIONS

This work proved that the initial concentration of biomass influenced the bubble sizes in the ozone-flotation process, regardless of the applied ozone flow. The size of bubbles significantly affected the harvesting efficiency. For each biomass content studied (500, 700 and 1000 mg/L), 3 flows (0.2, 0.6 and 1 L/min) were applied. An increased biomass concentration improved the harvesting efficiency. Also, as expected, low flows produced small bubbles and high flows produced large bubbles. For the initial biomass of 500 mg/L the best ozone flow was 0.6 L/min with a bubble size of  $2016 \pm 449 \mu\text{m}$  on average, and a maximum harvesting efficiency of 89%. For the biomasses of 700 and 1000 mg/L the best

flow was 0.2 L/min with efficiencies of 88 and 92%, respectively; and a mean bubble size of  $1191 \pm 501 \mu\text{m}$  for 700 mg/L, and  $1022 \pm 511 \mu\text{m}$  for 1000 mg/L.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*DrAZsx. María Teresa Orta Ledesma. E-mail address: [tol@pumas.iingen.unam.mx](mailto:tol@pumas.iingen.unam.mx).

Phone: +52 55 56233672; Fax: +52 55 56162164

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors appreciate the financial support provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and Secretaría de Energía (SENER), project 220704. The experimental work was carried out in the Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Instituto de Ingeniería, UNAM.

## REFERENCES

- [1] N.R. Moheimani, M.A. Borowitzka, Limits to productivity of the alga *Pleurochrysis carterae* (haptophyta) grown in outdoor raceway ponds, *Biotechnology and Bioengineering*. 96 (2007) 27–36. doi:10.1002/bit.21169.
- [2] A. Singh, P.S. Nigam, J.D. Murphy, Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels, *Bioresource Technology*. 102 (2011) 10–16. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.032.
- [3] Y. Zhou, L. Schideman, G. Yu, Y. Zhang, A synergistic combination of algal

wastewater treatment and hydrothermal biofuel production maximized by nutrient and carbon recycling, *Energy & Environmental Science.* 6 (2013) 3765.  
doi:10.1039/c3ee24241b.

- [4] A. Dermibas, M. Fatih Dermibas, *Algae Energy: Algae as a new source o biodiesel*, 2010. doi:10.1007/978-1-84996-050-2.
- [5] B.H. Lee, W.C. Song, B. Manna, J.K. Ha, Dissolved ozone flotation (DOF) - a promising technology in municipal wastewater treatment, *Desalination.* 225 (2008) 260–273. doi:10.1016/j.desal.2007.07.011.
- [6] N. Betzer, Y. Argaman, Y. Kott, Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation, *Water Research.* 14 (1980) 1003–1009. doi:10.1016/0043-1354(80)90144-X.
- [7] G.A. Oliveira, E. Carissimi, I. Monje-ramírez, S.B. Velasquez-orta, R.T. Rodrigues, M.T. Orta Ledesma, Comparison between coagulation-flocculation and ozone-flotation for Scenedesmus microalgal biomolecule recovery and nutrient removal from wastewater in a high-rate algal pond, *Bioresource Technology.* 259 (2018) 334–342. doi:10.1016/j.biortech.2018.03.072.
- [8] M.T. Valeriano González, I. Monje-Ramírez, M.T. Orta Ledesma, J. Gracia Fadrique, S.B. Velásquez-Orta, Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction, *Biomass and Bioenergy.* 95 (2016) 109–115. doi:10.1016/j.biombioe.2016.09.020.
- [9] M.T. Orta Ledesma de Velásquez, I. Monje-Ramírez, S. Velasquez-Orta, V. Rodriguez-Muñiz, I. Yáñez-Noguez, Ozone for Microalgae Biomass Harvesting from Wastewater, *Ozone: Science and Engineering.* 39 (2017) 264–272.

- doi:10.1080/01919512.2017.1322488.
- [10] O. Komolafe, S.B. Velasquez Orta, I. Monje-Ramirez, I.Y. Noguez, A.P. Harvey, M.T. Orta Ledesma, Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater, *Bioresource Technology*. 154 (2014) 297–304. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.048.
- [11] S.B. Velasquez-Orta, R. Garcia-Estrada, I. Monje-Ramirez, A. Harvey, M.T. Orta Ledesma, Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries, *Biomass and Bioenergy*. 70 (2014) 356–363.  
doi:10.1016/j.biombioe.2014.08.022.
- [12] Y.L. Cheng, Y.C. Juang, G.Y. Liao, P.W. Tsai, S.H. Ho, K.L. Yeh, C.Y. Chen, J.S. Chang, J.C. Liu, W.M. Chen, D.J. Lee, Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation, *Bioresource Technology*. 102 (2011) 82–87.  
doi:10.1016/j.biortech.2010.04.083.
- [13] C.H. Wong, M.M. Hossain, C.E. Davies, Performance of a continuous foam separation column as a function of process variables, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 24 (2001) 73–81. doi:10.1007/s004490100225.
- [14] T. Coward, J.G.M. Lee, G.S. Caldwell, The effect of bubble size on the efficiency and economics of harvesting microalgae by foam flotation, *Journal of Applied Phycology*. 27 (2015) 733–742. doi:10.1007/s10811-014-0384-5.
- [15] C.. Birdsall, A.C. Jenkins, E. Spadiner, Iodometric Determination of Ozone, *Analytical Chemistry*. 24 (1952) 662–664. doi:10.1021/ac60064a013.
- [16] D. Beneventi, F. Almeida, N. Marlin, D. Curti, L. Salgueiro, M. Aurousseau, Hydrodynamics and recovered papers deinking in an ozone flotation column, *Chemical*

- Engineering and Processing: Process Intensification. 48 (2009) 1517–1526.  
doi:10.1016/j.cep.2009.10.007.
- [17] A.G. Gornall, charles j. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, Journal of Biological Chemistry. 177 (1948) 751–766.
- [18] R.K. Henderson, S.A. Parsons, B. Jefferson, Surfactants as bubble surface modifiers in the flotation of algae: Dissolved air flotation that utilizes a chemically modified bubble surface, Environmental Science and Technology. 42 (2008) 4883–4888.  
doi:10.1021/es702649h.
- [19] A.S. Reis, M.A.S. Barrozo, A study on bubble formation and its relation with the performance of apatite flotation, Separation and Purification Technology. 161 (2016) 112–120. doi:10.1016/j.seppur.2016.01.038.
- [20] J. Hanotu, H.C.H. Bandulasena, W.B. Zimmerman, Microflotation performance for algal separation, Biotechnology and Bioengineering. 109 (2012) 1663–1673.  
doi:10.1002/bit.24449.
- [21] T. Coward, J.G.M. Lee, G.S. Caldwell, Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass, Algal Research. 2 (2013) 135–144.  
doi:10.1016/j.algal.2012.12.001.
- [22] Y.L. Cheng, Y.C. Juang, G.Y. Liao, S.H. Ho, K.L. Yeh, C.Y. Chen, J.S. Chang, J.C. Liu, D.J. Lee, Dispersed ozone flotation of Chlorella vulgaris, Bioresource Technology. 101 (2010) 9092–9096. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.016.
- [23] S. Şirin, E. Clavero, J. Salvadó, Potential pre-concentration methods for Nannochloropsis gaditana and a comparative study of pre-concentrated sample

- properties, *Bioresource Technology*. 132 (2013) 293–304.  
doi:10.1016/j.biortech.2013.01.037.
- [24] Y. Chi, L. Qiao, S. Zuo, H. Yan, C. Du, H. Hwang, P. Wang, Submerged liquid fermentation of *Ulva prolifera* Müller tissue and applications for improving growth performance in juvenile abalone (*Haliotis discus hannai* Ino), *Journal of Applied Phycology*. (2018) 1–9. doi:10.1007/s10811-018-1413-6.

## 5. DISCUSSÃO

O problema das águas residuais afeta muitas regiões no Brasil e a falta de tratamento e a disposição inadequada causam diversos problemas. Uma solução economicamente viável proposta nessa tese foi utilizar efluentes sanitários para cultivo e crescimento de microalgas. Uma das principais vantagens de interesse econômico é a redução dos custos com o tratamento dos efluentes sanitários, na qual as microalgas fazem esse tratamento, removendo os nutrientes e os utilizando para seu crescimento. Após o tratamento dos efluentes sanitários, essa água pode regressar para os corpos hídricos e as microalgas utilizadas para fins como a produção de biocombustível.

Um dos maiores problemas na produção de biocombustíveis a partir de microalgas é o alto custo de colheita. O custo de colheita de biomassa pode ser de 20-30% do custo total de produção de biocombustíveis (RAWAT et al., 2011). Utilizando efluente sanitário como fonte de nutrientes o custo seria reduzido, pois ao invés de agregar fertilizantes para o crescimento das microalgas utilizaria os nutrientes provenientes dos efluentes sanitários e em contrapartida estaria solucionando um problema e reduzindo custos no tratamento. As microalgas da espécie *Scenedesmus obliquus* se mostraram eficientes na remoção dos nutrientes, chegando a obter completa remoção de nitrogênio amoniacal, 93% de nitrogênio total e 61% de ortofosfato. Em alguns estudos, como o realizado por Gupta et al. (2016) a espécie *Scenedesmus obliquus* obteve uma remoção de  $99 \pm 3\%$  para nitrogênio e  $98 \pm 4\%$  de ortofosfato, enquanto Sacristán de Alva et al. (2013), utilizando águas residuárias pré-tratadas para o cultivo de *Scenedesmus acutus*, alcançaram 66% de remoção de fósforo e 94% para nitrogênio orgânico.

Após o tratamento das águas residuais pelo crescimento das microalgas, foram avaliados dois métodos de colheita. Um método tradicional e bem solidificado (coagulação-flocação) com eficiência comprovada (REIS e LABRA, 2016) e um método inovador (ozônio flotação) que a investigação apenas teve início nos anos 80 (BETZER; ARGAMAN; KOTT, 1980).

Para a geração de biocombustível as microalgas devem produzir biomoléculas, principalmente os lipídeos para a geração de biodiesel. O interesse em comparar os dois métodos de colheita foi avaliar o efeito na produção destas. E como esperado, a ozônio flotação, devido ao grande efeito oxidante do ozônio, teve maior recuperação das biomoléculas (lipídeos, carboidratos e proteínas que foram de  $0,32 \pm 0,03$ ,  $0,33 \pm 0,025$  e  $0,58 \pm 0,014$  mg/mg de biomassa) comparado com a coagulação-flocação ( $0,21$  mg de lipídeos/mg de biomassa e  $0,12 - 0,23$  mg de proteína/mg de biomassa). Em estudos anteriores, Velasquez-Orta et al. (2014) encontraram uma recuperação de biomassa de 79% e um rendimento lipídico de 0,12

mg de lipídeos/mg de biomassa, utilizando doses mais altas de ozônio (0,23 mg O<sub>3</sub>/mg de biomassa) e menor concentração de microalgas (420 mg SST/L). Valeriano-González et al. (2016), obtiveram uma recuperação de 75% da biomassa, com um rendimento lipídico de 0,16 mg lipídios/mg de biomassa, com concentração de ozônio de 0,14 mg O<sub>3</sub>/mg de biomassa, mas uma menor concentração de microalgas (400 mg/L).

Mesmo obtendo uma recuperação de biomassa de até 98%, comparado a ozônio flotação que teve no máximo 62% utilizando uma concentração de ozônio de 0,14 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa. No entanto nesse primeiro momento não se levou em consideração a biomassa oxidada, apenas o que foi recuperado. Visto posteriormente em outros testes de laboratório que o ozônio oxidou de 8 a 32% da biomassa inicial. E então foram obtidas eficiências de até 91.5% com uma concentração de ozônio de 0,16 mg de O<sub>3</sub>/mg de biomassa. Além do mais por ozônio flotação pode se concentrar a biomassa em aproximadamente 11 vezes, sendo representativa a redução de volume.

Devido as lacunas sobre a ozônio flotação buscou-se investigar mais sobre essa técnica e os principais parâmetros que influem na sua eficiência. Na flotação de forma geral, o tamanho das bolhas influencia diretamente na eficiência do sistema, no efeito de colisão, adesão e estabilidade na relação floco/bolha. Principalmente no caso da ozônio flotação em que as bolhas, além das propriedades físicas para flotar as partículas, têm como função desestabilizar as células de microalgas fazendo com que se transfira mais ozônio, reduza sua carga superficial e proporcione sua flotação. Além disso, a relação bolha/microalga gera a liberação de proteínas com atividade surfactante que reduzem a tensão superficial e evita o processo de coalescência das bolhas, favorecendo um maior tempo de contato e possível desprendimento das células de microalgas das bolhas de ozônio. Coward et al. (2013) descreveram o mecanismo de formação de bolhas como uma função do tamanho da bolha e da velocidade de elevação como uma característica chave que afeta significativamente a eficiência da colheita de microalgas.

Essa tese determina o tamanho e distribuição das bolhas por ozônio flotação em um sistema trifásico (efluente sanitário – microalgas – bolhas de ozônio). A maior dificuldade para se obter o diâmetro das bolhas foi devido à grande turbidez proporcionada pelas microalgas, porém medir as bolhas sem agregar os cultivos não teria as mesmas propriedades. Logo, foi realizada a captura das imagens diretamente na coluna de flotação com o cultivo de microalga em efluente sanitário e então medida manualmente as bolhas no software *Image Tools*, ou seja, medidas bolha por bolha.

As variáveis que mais influem no tamanho das bolhas em ozônio flotação é a vazão de ozônio aplicado e a concentração da biomassa inicial, quanto maior a concentração de biomassa

maior a concentração de proteínas. Primeiramente foi avaliado o efeito das proteínas no tamanho das bolhas e para isso foram capturadas imagens em diferentes alturas da coluna e com diferentes vazões (0.2, 0.6 e 1 L/min) e mantida a concentração de biomassa (500 mg/L). Depois foi avaliado o efeito da concentração inicial de biomassa (500, 700 e 1000 mg/L) e as vazões de ozônio (0.2, 0.6 e 1 L/min) no tamanho das bolhas.

Como esperado, a vazão de ozônio influenciou no tamanho das bolhas. Quando se manteve a concentração de biomassa (500 mg/L), assim como quando se variou as concentrações de biomassa (500, 700 e 1000 mg/L), a resposta foi a mesma. Obtiveram-se tamanhos de bolhas menores para a vazão de 0.2 L/min e tamanhos maiores para o de 1 L/min, vazão de gás maior gera bolhas maiores.

O aumento da concentração de biomassa ( $> 700$  mg/L) proporcionou um aumento na liberação de proteínas na coluna de flotação ( $> 750$  mg/L), assim como para ambas as vazões (0.2, 0.6 e 1 L/min) houve redução no tamanho das bolhas conforme aumentava a biomassa. Por exemplo, para a biomassa de 500 mg/L o tamanho médio das bolhas para a vazão de 0.2 L/min foi de 1964  $\mu\text{m}$  e para a vazão de 1 L/min foi de 3038  $\mu\text{m}$ , para a biomassa de 700 mg/L foi de 1191  $\mu\text{m}$  para a vazão de 0.2 L/min e de 2619  $\mu\text{m}$  para 1 L/min e para a biomassa de 1000 mg/L o tamanho médio das bolhas foi de 1021  $\mu\text{m}$  e 2535  $\mu\text{m}$  para 0.2 e 1 L/min, respectivamente. As maiores diferenças foram para a biomassa de 500 mg/L, não se obteve muita diferença entre os tamanhos das bolhas para a biomassa de 700 e 1000 mg/L, demonstrando que a maior liberação de proteínas não influenciou tanto quanto a menor biomassa (500 mg/L). As proteínas liberadas pelas microalgas exibem atividade surfactante, reduzindo a tensão superficial das bolhas e evitando a coalescência (GONZÁLEZ et al., 2016).

## 6. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Diante dos resultados obtidos a partir do estudo de ozônio flotação na colheita de microalgas cultivadas em efluente sanitário visando geração de biocombustível, de acordo com os objetivos propostos pode-se concluir que:

As microalgas foram eficientes no tratamento de águas residuais resultando em uma completa remoção de nitrogênio amoniacal, 93% de nitrogênio total e 61% na remoção de ortofosfatos, além dos nutrientes favorecerem seu crescimento.

Com ozônio flotação foram obtidos melhores resultados de qualidade da água para a maioria dos parâmetros avaliados ( $\text{NH}_3\text{-N}$ , NTK, nitrato e nitrito), exceto para ortofosfato e maior recuperação de lipídeos, carboidratos e proteínas com  $0,32 \pm 0,03$ ,  $0,33 \pm 0,025$  e  $0,58 \pm 0,014$  mg/mg de biomassa, respectivamente, quando comparado a coagulação/flocação, com recuperação de biomassa de no máximo 62% com uma concentração de ozônio de 0,14 mg de  $\text{O}_3$ /mg de biomassa porem quando aplicado uma concentração de 0,16 mg de  $\text{O}_3$ /mg de biomassa a eficiência alcançou até 91.5%. Em contraste, houve baixa extração de lipídeos e proteínas de 0,21 mg de lipídeos/mg de biomassa e 0,12-0,23 mg de proteínas/mg de biomassa para o processo de coagulação/flocação com alta recuperação de biomassa (85-98%).

A técnica de imagens para a determinação do tamanho das bolhas de ozônio durante o processo de ozônio flotação na colheita de microalgas se mostrou eficiente, no entanto, devido à alta turbidez não se pode realizar medidas automaticamente, sendo então medidas manualmente bolha por bolha.

As bolhas de ozônio estão diretamente relacionadas as vazões de ozônio aplicadas e a concentração de biomassa inicial, além de apresentar diferentes formas ao longo do tempo de colheita. Nos primeiros minutos de ozonização não se pode visualizar as bolhas nas imagens capturadas devido à alta turbidez, quando se inicia a colheita das microalgas as bolhas são menores e mais regulares, já após a clarificação da água as bolhas se tornaram irregulares e maiores. E foi observado que quanto maior a vazão de ozônio aplicada (1 L/min) maior o tamanho das bolhas, bolhas menores foram observadas em vazões menores (0.2 L/min). O mesmo foi observado para as concentrações de biomassa inicial, onde a menor concentração (500 mg/L) obteve maiores tamanhos de bolhas e em maiores concentrações microalgal (1000 mg/L) menores tamanhos de bolhas, isso foi notado em todas as vazões de ozônio avaliado (0.2, 0.6 e 1 L/min).

Foram obtidas melhores recuperações de biomassa com a concentração de ozônio de 0,16 mg de  $\text{O}_3$ /mg de biomassa que para 0,14 mg de  $\text{O}_3$ /mg de biomassa. A vazão de ozônio

influenciou na recuperação e na oxidação da biomassa assim como a concentração de biomassa inicial, sendo encontrada recuperação de 53 até 91.5% e oxidação de 8 até 30%.

As proteínas agiram como tensoativos reduzindo a coalescência apenas para a vazão de 0.6 L/min com uma concentração inicial de biomassa de 500 mg/L, onde foi obtida maior liberação das proteínas na coluna.

Ambas as vazões de ozônio aplicados reduziram o potencial zeta das células de microalga, no entanto para a vazão de 0.6 L/min a carga das microalgas passou a ser positiva (3.17 mV) e para as demais vazões houve uma redução porem menor, principalmente para a vazão de 1 L/min (-12.1 mV) onde o tamanho das bolhas são maiores e reduzem o tempo de contato bolha/partícula.

Para todas as vazões de ozônio o tamanho médio das bolhas foi menor para as maiores concentrações de biomassa (700 e 1000 mg/L), devido à maior liberação de proteínas na coluna (>750 mg/L). Já a viscosidade não teve efeito significativo no tamanho das bolhas de ozônio e as bolhas menores facilitaram a transferência de ozônio (83.5-86.3%) devido a maior área superficial, maior tempo de contato bolha/partícula, diferente das bolhas maiores que obtém menor transferência (69.5-78.8%).

Para futuros trabalhos recomenda-se:

- Avaliar o carbono orgânico total na mineralização e toxicidade.
- Analisar o efeito das proteínas quanto a coalescência das bolhas em diferentes concentrações de biomassa (700 e 1000 mg/L) já que essas concentrações apresentaram maior liberação de proteínas.
- Modificar a forma de captura de imagens para que possa ser realizada medições automáticas nos *softwares* disponíveis.
- Determinar a influência do tempo de captura da imagem ao longo do processo de ozônio flotação no tamanho das bolhas e liberação das proteínas.
- Avaliar o efeito do ozônio na ruptura das células de microalgas.
- Avaliar o efeito do sulfato de alumínio retido nas células para a geração de biocombustível.

## REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2243–2257, 2007.
- AL-ABDULY, A. et al. Characterization and optimization of an oscillatory baffled reactor (OBR) for ozone-water mass transfer. **Chemical Engineering and Processing**, v. 84, p. 82–89, 2014.
- APHA – AMERICAN PUBLIC HEALT ASSOCIATION. **Standard methods for the Examination of Water and Wastewater**, 2012.
- ASSIS, R. S. S. **Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistinas por flotação por ar dissolvido – estudo em escala de bancada utilizando sulfato de alumínio e cloreto férrico como coagulantes**. 2006. 137 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) –Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- ATA, S.; JAMESON, G. J. The formation of bubble clusters in flotation cells. **International Journal of Mineral Processing**, v. 76, p. 123-139, 2005.
- BAHR, M. et al. Microalgal-Biotechnology As a Platform for an Integral Biogas Upgrading and Nutrient Removal from Anaerobic Effluents. **Environ. Sci. Technol.**, v. 48, p. 573–581, 2014.
- BARNES, H., BLACKSTOCK, J. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. **J. Exp. Mar. Bio. Ecol.**, v. 12, p. 103–118, 1973.
- BARROS, A. I. et al. Harvesting techniques applied to microalgae: a review. **Renew. and Sustain. Energy Review**, v. 41, p. 1489–1500, 2015.
- BENEVENTI, D. et al. Hydrodynamics and recovered papers deinking in an ozone flotation column. **Chem. Eng. Process. Process Intensif.** v. 48, p. 1517–1526, 2009.
- BETZER, N.; ARGAMAN, Y.; KOTT, Y. Effluent treatment and algae recovery by ozone-induced flotation. **Water Research**, v. 14, p. 1003–1009, 1980.
- BIRDSALL, C.; JENKINS, A.; SPADINGER, E. Iodometric determination of ozone. **Anal. Chemistry**, v. 24, p. 662-664, 1952.
- BORGES, C. B. **Biomassa de microalgas: separação da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* por coagulação, floculação e flotação por ar dissolvido**. 2014, 92 p. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.
- BORGES, F. C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. 2010, 105 p. Dissertação (Mestre em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

BRABCOVÁ, S. et al. Bubble-particle collision interaction in flotation systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 473, p. 95–103, 2015.

Brasil. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2015**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017. 212 p.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557–577, 2010.

BRENTNER, L.B.; ECKELMAN, M.J.; ZIMMERMAN, J.B. Combinatorial life cycle assessment to inform process design of industrial production of algal biodiesel. **Environ. Sci. Technology**, v. 45, p. 7060–7067, 2011.

CARISSIMI, E.; RUBIO, J. Advances in particulates aggregation-flotation separation. **Centenary of Flotation Symposium**. Brisbane, 2005.

CHEN, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p.1–10, 2013.

CHENG, Y. L. et al. Dispersed ozone flotation of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9092–9096, 2010.

CHENG, Ya. L. et al. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using dispersed ozone flotation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 82–87, 2011.

CHENG, Yu. S. et al. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of Chlorella. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1927–1933, 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHO, Y. S.; LASKOWSKI, J. S. Effect of flotation frothers on bubble size and foam stability. **International Journal of Mineral Processing**, v. 64, n. 2, p. 69-80, 2002.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnol. Advances**, v. 29, p. 686–702, 2011.

COWARD, T.; LEE, J. G. M.; CALDWELL, G. S. Development of a foam flotation system for harvesting microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2, p. 135–144, 2013.

COWARD, T.; LEE, J. G. M.; CALDWELL, G. S. The effect of bubble size on the efficiency and economics of harvesting microalgae by foam flotation. **J Appl Phycology**, v. 27, p. 733–742, 2015.

DANQUAH, M. K., et al. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. **J. Chem. Technol. Biotechnology**, v. 84, p. 1078–1083, 2009.

- DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresources Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.
- DEGLON, D. A.; MENSAH, D. E.; FRANZIDIS, J. P. Review of hydrodynamics and gas dispersion in flotation cells on South African platinum concentrators. **Mineral Engineering**, v. 13, n. 3, p. 235-244, 2000.
- DERJAGUIN, B. V., DUKHIN, S. S. Theory of flotation of small and medium size particles. **Trans. Inst. Min. Metall.**, v. 70, p. 221-246, 1961.
- DERMIBAS, A.; DERMIBAS, M. F. **Algae Energy**: Algae as a new source biodiesel. Ed. Springer. Germany, 2010, 197 p.
- DOBBY, G. S.; YIANATOS, J. B. FINCH, J. A. Estimation of bubble diameter in flotation columns from drift flux analysis. **Can. Metallurgical Quarterly**, v. 27, n. 2, p. 85-90, 1988.
- DUAN, J.; GREGORY, J. Coagulation by hydrolysing metal salts. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 100-102, p. 475–502, 2003.
- DUBOIS, M., et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- DRAGONE, G., et al. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, p. 3331–3335, 2011.
- EDZWALD, J. K. Dissolved air flotation and me. **Water Resources**, v. 44, p. 2077–2106, 2010.
- ELDRIDGE, R. J.; HILL, D. R. A.; GLADMAN, B. R. A comparative study of the coagulation behavior of marine microalgae. **J. Appl. Phycol.**, v. 24, p. 1667–1679, 2012.
- ELOKA-EBOKA, A. C.; INAMBAO, F. L. Effects of CO<sub>2</sub> sequestration on lipid and biomass productivity in microalgal biomass production. **Applied Energy**, v. 195, p. 1100–1111, 2017.
- ENGLERT, A. H. **Flotação por ar dissolvido (FAD) de micropartículas, caracterização de microbolhas e medidas de força de interação bolha-partícula**. 2008. 161 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 226 p.
- FINCH, J. A. et al. Gas dispersion properties: bubble surface area flux and gas holdup. **Minerals Engineering**, v. 13, n. 4, p. 365-372, 2000.
- FLORES-PAYÁN, V. et al. Parametric sensitivity analysis and ozone mass transfer modeling in a gas–liquid reactor for advanced water treatment. **J. Indust. Engin. Chemistry**, v. 21, p. 1270–1276, 2015.
- GARG, S.; LI, Y.; WANG, L.; SCHENK, P.M. Flotation of marine microalgae: effect of algal hydrophobicity. **Bioresour. Technology**, v. 121, p. 471–474, 2012.

GERARDO, M. L. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. **Algal Research**, v. 11, p. 248–262, 2015.

GONZÁLEZ, M. T. V. Harvesting microalgae using ozoflotation releases surfactant proteins, facilitates biomass recovery and lipid extraction. **Biomass and Bioenergy**, v. 95, p. 109-115, 2016.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biureto reaction. **J. Biol. Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1948.

GUDE, V. G. Wastewater treatment in microbial fuel cells e an overview. **Journal of Cleaner Production**, v. 122, p. 287-307, 2016.

GUPTA, S. K. et al. Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 115, p. 255-264, 2016.

GRAU, R. A.; HEISKANEN, K. Visual technique for measuring bubble size in flotation machines. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 507–513, 2002.

GREENWELL, H. C. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **J. R. Soc. Interface**, v. 7, p. 703–726, 2010.

GRIMA, E. M. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

HANOTU, J.; BANDULASENA, H. C. H.; ZIMMERMAN, W. B. Microflotation performance for algal separation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 109, p. 1663–1673, 2012.

HE, L. et al. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. **Renew. Sust. Energy Ver.**, v. 71, p. 388–403, 2017.

HENDERSON, R. K.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. Surfactants as bubble surface modifiers in the flotation of algae: dissolved air flotation that utilizes a chemically modified bubble surface. **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, p. 4883–4888, 2008.

HENDERSON, R. K.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. The potential for using bubble modification chemicals in dissolved air flotation for algae removal. **Separ. Sci. Technol.**, v. 44, n. 9, p. 1923–1940, 2009.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244–252, 2012.

HOIGNE, J.; BADER, H. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water - I Non-dissociating organic compounds. **Water Resource**, v. 17, n. 2, p. 173-183, 1983.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263-2283, 2005.

KIM, G. Y. et al. Scenedesmus-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 235–240, 2015.

KIM, J. H.; KIM, H. S.; LEE, B. H. Combination of sequential batch reactor (SBR) and dissolved ozone flotation pressurized ozone oxidation (DOF-PO<sub>2</sub>) processes for treatment of pigment processing wastewater. **Environmental Engineering Research**, v. 16, n. 2, p. 97–102, 2011.

KOMOLAFE, O. et al. Biodiesel production from indigenous microalgae grown in wastewater. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 297–304, 2014.

LABBÉ, J. I. et al. Microalgae growth in polluted effluents from the dairy industry for biomass production and phytoremediation. **J. Environ. Chem. I Engineering**, v. 5, p. 635–643, 2017.

LAPOLLI, F. R. et al. Desinfecção de efluentes sanitários por meio da ozonização. In: GONÇALVES, R. F. (Coord.). **Desinfecção de efluentes sanitários, remoção de organismos patógenos e substâncias nocivas: aplicação para fins produtivos como agricultura, aquicultura e hidropônica**. 1 ed. Vitória: PROSAB, 2003. p. 169-208.

LEE, B. H.; SONG, W. C. High concentration of ozone application by the DAF (Dissolved Air Flotation) system to treat livestock wastewater. Water Pollution VIII: Modelling, Monitoring and Management. **Ecology and the Environment**, v. 95, p. 561–569, 2006.

LEE, B. H. et al. Dissolved ozone flotation (DOF) — a promising technology in municipal wastewater treatment. **Desalination**, v. 225, p. 260–273, 2008.

LEE, B. H. et al. Effects of ozone in treating drinking water by DAF system. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 9, n 3, p. 247–252, 2009.

LEGENDRE, D.; SARROT, V.; GUIRAUD, P. On the particle inertia-free collision with a partially contaminated spherical bubble. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 35, p. 163–170, 2009.

LEKSHMI, B. et al. Studies on reduction of inorganic pollutants from wastewater by Chlorella pyrenoidosa and Scenedesmus abundans. **Alexandria Engineering Journal**, v. 54, p. 1291–1296, 2015.

LEWIS, W. K.; WHITMAN, W. G. Principles of Gas Absorption. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 16, n. 12, p. 1215-1220, 1924.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água**. São Paulo, Campinas: Átomo, 2010. 494 p.

FÉRIS, L. A. **Aproveitamento de subprodutos do beneficiamento do carvão na remoção de poluentes por sorção-flotação FAD**. 2001, 176 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

LIN, B. et al. Bubble size estimation for flotation processes. **Minerals Engineering**, v. 21, p. 539–548, 2008.

MA, J. Effect of preozonation on characteristics of algae cells and algae-derived organic matter (AOM) with respect to their removal by coagulation. **Water Sci. and Technol.: Water Supply**, v. 6, n. 4, p. 145–152, 2006.

MAHYAR, A. et al. Empirical determination and modeling of ozonemass transfer in a planar falling film reactor. **Chem. Engin. research and design**, v. 121, p. 287–294, 2017.

MALDONADO, M. et al. Automatic control of bubble size in a laboratory flotation column. **International Journal of Mineral Processing**, v. 141, p. 27–33, 2015.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnology**, v. 84, p. 281–291, 2009.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renew. Sust. Energy Rev.**, v. 14, p. 217–232, 2010.

MENETREZ, M.Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environ. Sci. Technol.**, v. 46, p. 7073–7085, 2012.

METCALF, L.; EDDY, H. P. (1991). **Wastewater Engineering**: Treatment, Disposal and Reuse. 3 ed. New York: Mc Graw – Hill, 1991, 1334 p.

MEYER, C. J; DEGLON, D. A. Particle collision modeling – A review. **Minerals Engineering**, v. 24, p. 719–730, 2011.

MITANI, M. M.; et al. Mass Transfer of Ozone Using a Microporous Diffuser Reactor System. **Ozone:Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 45 – 51, 2005.

MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. The long-term culture of the cocolithophore *Pleurochrysis carterae* (Haptophyta) in outdoor raceway ponds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 703–712, 2006.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER G. C. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. John Wiley & Sons, New York, 2007.

MORUZZI, R. B. **Avaliação da influência da distribuição de partículas e do binômio velocidade/tempo de detenção na zona de reação no desempenho da flotação com utilização de sonda ultrasônica e técnica de análise por imagem**. 2005, 263 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.

NGUYEN, T. L. Effects of ozone and peroxone on algal separation via dispersed air flotation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p246– 250, 2013.

PAHL, S. et al. Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass algae for biofuels and energy. In: **Borowitzka MA**, Moheimani NR (eds) Algae for biofuels and energy. Springer, Dordrecht, p. 165–185, 2013.

PENNA, R. et al. Estudo comparativo entre dois sistemas de aeração de coluna de flotação. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 56, n. 1, p. 195-200, 2003.

- PHAN, C. M. et al. Investigations of bubble–particle interactions. **International Journal of Mineral Processing**, v. 72, p. 239-254, 2003.
- RALSTON, J.; DUKHIN, S. S.; MISHCHUK, N. A. Wetting film stability and flotation kinetics. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 95, p. 145-236, 2002.
- RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411–3424, 2011.
- REIS, A. S.; BARROZO, M. A. S. A study on bubble formation and its relation with the performance of apatite flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 161, p. 112–120, 2016.
- REIS, A. S. **Estudo da geração de bolhas de diversos tamanhos em coluna de flotação**. 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2015.
- REIS, S. L. **Caracterização do resíduo ozonizado da microalga *Scenedesmus obliquus* BR003 e sua utilização em novos cultivos**. 2014. 67 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2014.
- Reyes, J. F.; Labra, C. Biomass harvesting and concentration of microalgae *scenedesmus* sp. cultivated in a pilot phobioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 87, p. 78-83, 2016.
- RIQUELME, A. et al. Identification of a non-linear dynamic model of the bubble size distribution in a pilot flotation column. **Inter. Jour. Mineral Proces.**, v. 145, p. 7–16, 2015.
- RODRIGUES, R. T. **Desenvolvimento da Técnica LTM-BSizer para a Caracterização de Bolhas e Avaliação de Parâmetros no Processo de Flotação**. 2004, 132 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2004.
- RODRIGUES, R. T.; RUBIO, J. DAF – dissolved air flotation: Potential applications in the mining and mineral processing industry. **International Journal of Mineral Processing**, v. 82, n. 1, p. 1-13, 2007.
- ROSHCHINA, V. V; ROSHCHINA, V. D. **Ozone and plant cell**. Springer, 2003, 273 p.
- RUBIO, J.; SOUZA, M. L.; SMITH, R.W. Overview of flotation as a wastewater treatment technique. **Minerals Engineering**, v. 15, p. 139-155, 2002.
- SCHUHMANN, Jr. R. Flotation kinetics. I methods for steady-state study of flotation problems. **J. Phys. Chem.**, v. 46, p. 891-902, 1942.
- SCHROEDER, E. D. **Water and wastewater treatment**. Tóquio, Japão: International Student, 1977, 370 p.
- SHARMA, K. K. et al. Critical analysis of current microalgae dewatering techniques. **Biofuels**, v. 4, p. 397–407, 2013.

SHEN, Q. H. et al. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 257–263, 2015.

SHUKLA, C.; KUNDU, G.; MUKHERJEE, D. Study of gas holdup and pressure characteristics in a column flotation cell using coal Satish. **Minerals Engineering**, v. 23 p. 636–642, 2010.

SING, S. F. et al. Production of biofuels from microalgae. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 47–72, 2011.

SOARES, L. V. **Ozonização de esgoto sanitário: estudo da hidrodinâmica, transferência de massa e inativação de microrganismos indicadores**. 2007, 249 p. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

STURM, B. S. M.; LAMER, S. L. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. **Appl. Energy**, v. 88, p. 3499–3506, 2011.

TAVERA, F. J.; ESCUDERO, R.; FINCH, J. A. Gas holdup in flotation columns: laboratory measurements. **Inter. J. of Mineral Processing**, v. 61, p. 23 – 40, 2001.

TRIPATHI, R.; SINGH, J.; THAKUR, I. S. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO<sub>2</sub> sequestration and biodiesel production. **Renew Energy**, v. 74, p. 774–81, 2015.

UDUMAN N. et al. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. **J. Renew. Sustain. Energy**, v. 2, p. 1-15, 2010.

VANDAMME, D.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 233-239, 2013.

VASUDEVAN, P.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiol. and Biotechnol.**, v. 35, p. 421-430, 2008.

VAZIRIZADEH, A.; BOUCHARD, J.; CHEN, Y. Effect of particles on bubble size distribution and gas hold-up in column flotation. **International Journal of Mineral Processing**, v. 157, p. 163–173, 2016.

VELASQUEZ-ORTA, V. S. B. et al. Microalgae harvesting using ozoflotation: Effect on lipid and FAME recoveries. **Biomass and Bioenergy**, v. 70, p. 356 – 363, 2014.

VIEIRA, A. M. **Efeito da granulometria na flotação de quartzo**. 2005, 166 p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005.

WANG B. et al. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 79, p. 707–718, 2008.

WANG, G. et al. The dynamic contact angle of a bubble with an immersed-in-water particle and its implications for bubble–particle detachment. **Inter. Journal of Mineral Processing**, v. 151, p. 22–32, 2016.

WILINSKI, P.; NAUMCZYK, J. Dissolved Ozone Flotation as a innovative and prospect method for treatment of micropollutants and wastewater treatment costs reduction. Daniel Thevenot. **Anais...**12th edition of the World Wide Workshop for Young Environmental Scientists (WWW-YES-2012) - Urban waters: resource or risks?, May 2012, Arcueil, France.

WILLIAMS, P. J. L. B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ. Sci.**, v. 3, p. 554–590, 2010.

WONG, C. H.; HOSSAIN, M. M.; DAVIES, C. E. Performance of a continuous foam separation column as a function of process variables. **Bioprocess Biosyst Eng.**, v. 24, p. 73–81, 2001.

ZHOU, Y. et al. A synergistic combination of algal wastewater treatment and hydrothermal biofuel production maximized by nutrient and carbon recycling. **Energy Environ. Sci.**, v. 6, p. 3765-3779, 2013.

ZHU, B. Molecular characterization of CO<sub>2</sub> sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. **Bioresource Technology**, p. 2-9, in press, 2017.