



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GABRIELA SCHOLANTE DELABARY

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE TRÊS MICROALGAS
PARA A REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE EFLUENTE DE
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE DEJETOS SUÍNOS**

FLORIANÓPOLIS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Gabriela Scholante Delabary

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE TRÊS MICROALGAS
PARA A REMOÇÃO DE NUTRIENTES DE EFLUENTE DE
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE DEJETOS SUÍNOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Delabary, Gabriela Scholante

Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluentes de estação de tratamento de dejetos suínos / Gabriela Scholante Delabary ; orientador, Hugo Moreira Soares - Florianópolis, SC, 2012.
163 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Tratamento Biológico. 3. Remoção de Nutrientes. 4. Suinocultura. 5. Microalgas. I. Soares, Hugo Moreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluentes de estação de tratamento de dejetos de suínos

Por

Gabriela Scholante Delabary

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares
orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Prof. Dr. Leonardo Rubi Rörig

Prof. Dr. Marcio Luis Busi da Silva

Florianópolis, 05 de setembro de 2012

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho á todos que
confiaram em mim e que contribuíram
para que este fosse concretizado.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente á Deus, pelas graças alcançadas no decorrer deste caminho e por iluminar meus passos nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Tasso e Sônia que sempre serviram de modelo de inspiração e dedicação. Pelo amor, carinho e compreensão na concretização de sonhos. Por eles e com o apoio deles acabo de finalizar mais uma etapa.

Aos meus irmãos Tássia e Henrique, pela compreensão da ausência e da distância, por vezes superadas através de ligações que serviam como aconchego e de incentivo para continuar na caminhada.

Ao Bruno, por servir de exemplo de dedicação e de profissional. Por confiar em mim e não me deixar abater por momentos difíceis, por compreender as ausências e retribuir com amor, carinho e muita paciência.

Ao professor e mestre Hugo Moreira Soares por me aceitar como aluna e permitir a realização do mestrado. Agradeço aos ensinamentos transmitidos ao longo deste período.

Aos amigos e colegas conquistados ao longo do caminho, principalmente do Laboratório, pelos ensinamentos e pela convivência diária. Estela, Camila, Janaína, Diane, Cléu, Marcos, Daiane, Micheli, Dominice, Camila e a Bárbara.

Ao Departamento de Engenharia Química pelo aceite e ao secretário Edevilson, pela prestação de serviços e seu empenho em colaborar sempre que possível.

A professora Ana Teresa Lombardi da UFSCar que gentilmente cedeu as microalgas para a realização deste trabalho.

A EMBRAPA por permitir o uso do efluente. Ao Marcelo Bortoli, por trazer á Florianópolis o efluente utilizado neste trabalho.

Aos alunos e á Denise do Laboratório Engebio por permitir o uso de equipamentos e pela compreensão da minha presença no decorrer do período de experimentos.

As amigas de sempre, que mesmo longe servem de inspiração e exemplo: Amanda, Luciana, Ida, Adeli. Aos amigos que conviveram comigo e compreenderam o humor e as ausências, Betina e Ronaldo. Vocês são importantíssimos! Aos professores Marcus Adonai e André Lima pelos ensinamentos transmitidos durante á graduação e pelo incentivo á vida científica. Ao professor Leonardo Rörig pelas informações passadas e por sempre me receber.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

E a todos que contribuíram para a realização e concretização deste trabalho!

RESUMO

A suinocultura é uma importante atividade social e econômica para todo o país, mas principalmente para o oeste do estado de Santa Catarina, já que é um dos maiores produtores nacionais. Entretanto, esta atividade é reconhecida por causar problemas ambientais significativos, quando não há um tratamento adequado dos resíduos gerados durante a produção, o que pode comprometer os recursos hídricos através do processo de eutrofização. Uma das alternativas que vem sendo desenvolvida e estudada para o tratamento destes resíduos é uso de microalgas, que promove benefícios na purificação dos efluentes, além de gerar biomassa de interesse comercial, agregando valor econômico ao processo de tratamento. Este trabalho avaliou o crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Haematococcus pluvialis* aplicadas na remoção de nutrientes de efluentes da criação de suínos. Foram avaliados os crescimentos das algas em meio sintético estéril e em amostras de efluente real. Todos os ensaios foram realizados em frascos erlenmayer, com volumes de 250 e 500 ml em triplicata, mantidos em câmara de DBO com 11 a 13 dias de incubação, sob temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, iluminação constante e intensidade luminosa $56 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O meio sintético apresentava concentração máxima de $113,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PO_4^{3-} e $224,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de NH_4^+ , já o efluente real possuía $41,55 \text{ mg.L}^{-1}$ para NH_4^+ , $9,60 \text{ mg.L}^{-1}$ de NO_3^- , $106,09 \text{ mg.L}^{-1}$ de NO_2^- e $2,97 \text{ mg.L}^{-1}$ de PO_4^{3-} . Observou-se que todas as microalgas cresceram em efluente sintético, sendo que *H. pluvialis* foi melhor para remoção dos nutrientes: fosfato (99,31%), amônio (85,78%) e com a maior produção de biomassa ($0,20 \text{ mg.L}^{-1}$). Para o efluente real, não foi observado crescimento de *S. quadricauda*, entretanto as microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* removeram respectivamente 93% (38,4 mg) e 97% (40,3 mg) de NH_4^+ , 77% (7,2 mg) e 83% (7,8 mg) e de NO_3^- , 31% (31,9 mg) e 9% (9,2 mg) de NO_2^- , atingindo uma biomassa de $65,2 \text{ mg.L}^{-1}$ e $70,9 \text{ mg.L}^{-1}$, bem como as velocidades de crescimento (K) 0,35 e 0,19 divisões. d^{-1} e por fim ambas promoveram a remoção de 100% de PO_4^{3-} . Desta forma, foi identificado que as microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* foram eficientes na remoção dos nutrientes presentes no efluente de dejetos suínos, indicando potencial para contribuir na melhoria da qualidade ambiental.

Palavras-chave: Remoção de Nutrientes, Microalgas, Suinocultura

ABSTRACT

Swine production is an important economic and social activity for the whole country, but especially to the west of the state of Santa Catarina, which is already one of the largest national producers. However, this activity is recognized to cause significant environmental problems, when there is an appropriate treatment of the waste produced during production, which may affect water resources through the process of eutrophication. One alternative that has been developed and studied for the treatment of such waste is using a microalga which promotes the benefits of purification of effluents, and to generate biomass of commercial interest, adding to the economic value of the treatment process. This study evaluated the growth of microalgae *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* and *Haematococcus pluvialis* applied in removing nutrients from wastewater of swine production. Was evaluated the growth of algae under sterile synthetic medium and effluent samples real. All tests were carried out in Erlenmeyer flasks with volumes of 250 and 500 ml in triplicate in chamber BOD of 11 to 13 days incubation at a temperature of $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ constant illumination and light intensity $56 \mu\text{mol. photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$. The synthetic medium presented maximum concentration of $113,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$ and $224,2 \text{ mg. L}^{-1} \text{ NH}_4^{+}$, since the real effluent had $41,5 \text{ mg. L}^{-1}$ for NH_4^{+} , $9,60 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^{-}$, $106,09 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2^{-}$ and $2,97 \text{ mg.L}^{-1} \text{ PO}_4^{3-}$. It was observed that all microalgae grown in synthetic wastewater, and *H. pluvialis* was best for removal of nutrients: phosphate (99,31%), ammonium (85,78%) and the highest biomass yield ($0,20 \text{ mg L}^{-1}$). For real effluent, no growth was observed for *S. quadricauda*, however microalgae *C. vulgaris* and *H. pluvialis* were removed respectively 93% (38,4 mg) and 97% (40,3 mg), NH_4^{+} , 77% (7,2 mg) and 83% (7,8 mg), and NO_3^{-} , 31% (31,9 mg) and 9% (9,2 mg), NO_2^{-} , reaching a biomass of 65.2 mg l^{-1} and 70.9 mg L^{-1} , as well as growth rates (K) 0,35 and 0,19 divisions.d⁻¹ and finally both promoted 100% removal of PO_4^{3-} . This way it was identified that the microalgae *C. vulgaris* and *H. pluvialis* were efficient in the removal of nutrients in the effluent from pig manure, indicating a potential to contribute to the improvement of environmental quality.

Keywords: Removal of Nutrients, Microalgae, Swine Production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferença das células procariota e célula eucariota.....	33
Figura 2- Árvore filogenética demonstrando a relação entre as algas eucariontes e outros organismos eucariontes baseado pela codificação da subunidade menor do rRNA.....	37
Figura 3- Imagem da microscopia óptica das células de <i>Chlorella vulgaris</i> com aumento de 1000X.....	39
Figura 4- Imagem da microscopia óptica das células de <i>S. quadricauda</i> com aumento de 1000X.....	40
Figura 5- Imagens de microscopia óptica das células vegetativas (a) e dos hematocistos (b) de <i>H. pluvialis</i> com aumento de 1000X.....	41
Figura 6- Possíveis metabolismos realizados pelas algas.....	42
Figura 7- Principais produtos das reações claras e escuras da fotossíntese.....	44
Figura 8- Visão de um cloroplasto e seus componentes, focando para a molécula de clorofila <i>a</i> , com estruturas policíclicas planas e um átomo central de magnésio (Mg).....	45
Figura 9- Representação esquemática para três modelos de alternativos de transporte e assimilação de P (a) modelo convencional contendo um único alternativa para o nutriente (b) modelo para diferentes tipos de fósforo, o inorgânico (SIP), e o polifosfato e o orgânico solúvel (SOP) (c) esquema proposto por MIYACHI et al. (1964), com duas alternativas distintas, sendo que em uma o SOP é sintetizada diretamente.....	49
Figura 10- Representação esquemática da dinâmica envolvida no tratamento de efluentes domésticos por meio de um sistema integrado bactérias- microalgas, onde deve haver movimentação constante no processo.....	62
Figura 11- Imagem da estação de tratamento de dejetos suínos da Embrapa Aves e Suínos, Concórdia, SC.....	73
Figura 12- Fluxograma da Estação de Tratamento de dejetos suínos da Embrapa Aves e Suínos, Concórdia, SC, com numeração indicativa a partir da descrição do processo e ênfase para o efluente utilizado no presente trabalho.....	74

Figura 13- Imagem dos frascos na câmara de DBO para o experimento com efluente real suíno.....	76
Figura 14- Acompanhamento do crescimento a partir da concentração de biomassa (mg.L^{-1}) e da remoções dos nutrientes PO_4^{-3} e NH_4^+ (mg.L^{-1}) das microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo.....	87
Figura 15- Acompanhamento da concentração de clorofila <i>a</i> (mg.m^3) para as microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo de cultivo.....	88
Figura 16- Acompanhamento do cultivo das microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricuda</i> e <i>H. pluvialis</i> para as análises de biomassa (mg.L^{-1}), PO_4^{-3} (mg.L^{-1}), NH_4^+ (mg.L^{-1}), NO_2^- (mg.L^{-1}) e NO_3^- (mg.L^{-1}) do experimento com efluente suíno em função do tempo.....	92
Figura 17- Comparação entre os efluentes reais antes e depois da inoculação das microalgas. Em a) meio após ser autoclavado sem inóculo e em b) ao fim do cultivo.....	93
Figura 18- Avaliação da concentração de biomassa (mg.L^{-1}) das microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo.....	94
Figura 19- Concentração de clorofila <i>a</i> (mg.L^{-1}) das microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo de cultivo no experimento com efluente suíno real.....	95
Figura 20- Concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo de cultivo para as microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> , no experimento com efluente suíno real.....	96
Figura 21- Remoção do nutriente amônio em função do tempo de cultivo para as microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> avaliadas no experimento com efluente suíno real.....	97
Figura 22- Acompanhamento do pH no meio de cultivo ao longo do tempo para as microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> avaliadas no experimento com efluente real.....	98
Figura 23- Avaliação da remoção do nutriente nitrato (mg.L^{-1}) pelas microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.....	99
Figura 24- Avaliação da remoção do nutriente nitrito (mg.L^{-1}) pelas microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.....	100

Figura 25- Avaliação da remoção do nutriente fosfato (mg.L^{-1}) pelas microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.....101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades dos principais grupos de algas.....	35
Tabela 2- Composição da solução estoque de micronutrientes e vitaminas do meio Water Culture – WC.....	70
Tabela 3- Composição dos macronutrientes do meio de cultura WC.....	70
Tabela 4. Composição do efluente sintético suíno.....	71
Tabela 5- Resultados médios (mg. L^{-1}) das análises realizadas no acompanhamento da EDTS - EMBRAPA, Concórdia, SC nos anos de 2005 e 2006.....	74
Tabela 6- Velocidades de crescimento (K), velocidade de consumo de substrato para PO_4^{3-} ($\mu_s\text{P}$) e também para NH_4^+ ($\mu_s\text{N}$), para <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i>	89
Tabela 7. Valores dos fatores de conversão de fosfato em célula ($Y_{X/P}$), nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$) e produtividade (P_x) para <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i>	90
Tabela 8- Valores obtidos de remoção para os íons PO_4^{3-} e NH_4^+ durante o experimento com efluente sintético.....	90
Tabela 9- Resultado da caracterização do efluente suíno proveniente da estação de tratamento de dejetos suínos da EMBRAPA, Concórdia, SC.....	91
Tabela 10- Resultados obtidos a partir dos cálculos da velocidade de crescimento (K) e velocidade de consumo de substrato (μ_s) cada uma das microalgas avaliadas.....	103
Tabela 11- Resultados dos fatores de conversão obtidos através do cálculo do consumo de substrato para cada composto inorgânico avaliado para as microalgas <i>C. vulgaris</i> , <i>S. quadricauda</i> e <i>H. pluvialis</i> no efluente real.....	103
Tabela 12- Resultados encontrados para a remoção dos nutrientes (%) e a concentração de biomassa (mg.L^{-1}) das microalgas avaliadas no experimento com efluente real.....	104

NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

K- Velocidade de crescimento (duplicação. d^{-1})
ABS – Absorbância;
ANOVA – Análise de Variância;
ATP – Adenosina Trifosfato;
CCM- Mecanismo de Concentração de Carbono;
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente;
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio;
DQO- Demanda Química de Oxigênio;
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;
ETDS – Estação de Tratamento de Dejetos Suínos;
FS I – Fotossistema I;
FS II – Fotossistema II;
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
LTBR- Laboratório Tratamento Biológico de Resíduos;
m – Massa inicial do filtro (g);
 m_0 – Massa final (g);
min – Minutos;
N-NH₄⁺ – Concentração de nitrogênio amoniacal ($mgN-NH_4^+L^{-1}$);
N-NO₂⁻ - Concentração de nitrogênio na forma de nitrito ($mgN-NO_2^-L^{-1}$);
N-NO₃⁻ - Concentração de nitrogênio na forma de nitrato ($mgN-NO_3^-L^{-1}$);
P – Produtividade ($mg.L^{-1}.d^{-1}$);
PX – Produtividade de biomassa ($mg.L^{-1}.d^{-1}$);
p < - Similaridade Estatística;
p > - Diferença Estatística;
P-PO₄³⁻ – Concentração de fósforo na forma de fosfato ($mg P-PO_4L^{-1}$);
RBA- Reator Biológico Aeróbio;
RUBISCO – Ribulose Bifosfato Carboxilase;
SC- Santa Catarina;
SST – Concentração de sólidos suspensos totais ($gSSTL^{-1}$);
SSV – Concentração de sólidos suspensos voláteis ($gSSVL^{-1}$);
THR - Tempo de retenção hidráulica (d);
UASB- Upflow Anaerobioc Sludge Blanket;
UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina;
UFSCar- Universidade Federal de São Carlos;
WC- Sigla meio de Cultura Water Culture;
X – Concentração celular (mgL^{-1});
 X_0 – Biomassa inicial (mgL^{-1});
X – Biomassa final (mgL^{-1});
 $Y_{X/P}$ – Fator de conversão de fósforo total em células ($mg X. mg P^{-1}$);
 $Y_{X/N}$ – Fator de conversão de nitrogênio total em células ($mg X. mg N^{-1}$);

η_N – Remoção de Nitrogênio (%);

η_P - Remoção de Fósforo (%);

$\mu_s N$ - Velocidade de consumo de Substrato Nitrogênio Total (d^{-1})

$\mu_s P$ - Velocidade de consumo de Substrato Total (d^{-1})

Λ – Comprimento de onda (nm);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
3.1. ALGAS	33
3.1.1. Definição e Características	33
3.1.2. Microalgas	34
3.1.3. Classificação	35
3.1.4. Divisão Chlorophyta	36
3.1.4.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	38
3.1.4.2. <i>Scenedesmus quadricauda</i>	39
3.1.4.3. <i>Haematococcus pluvialis</i>	40
3.2. METABOLISMO	41
3.2.1. Fotossíntese	43
3.2.2. Nutrientes	47
3.2.3. Assimilação de nitrogênio e fósforo	48
3.3. CONDIÇÕES DE CULTIVO	50
3.3.1. Intensidade Luminosa	51
3.3.2. Disponibilidade de Carbono	52
3.3.3. pH	53
3.3.4. Temperatura	53
3.3.5. Agitação e aeração nos cultivos	54
3.4. SUINOCULTURA	54
3.4.1. Problemas Ambientais associados à suinocultura	55
3.4.2. Legislação Ambiental	58
3.5. TRATAMENTO DE EFLUENTES COM MICROALGAS	59
3.5.1. Remoção de Nutrientes (Nitrogênio e Fósforo)	63
3.5.2. Efluentes Agropecuários	64
3.5.3. Efluentes da Suinocultura	64
4. MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1. OBTENÇÃO E ACLIMATAÇÃO DAS CEPAS	69

4.2 TESTES DE TOXICIDADE	71
4.2.1. Avaliações do Crescimento em Meio Suíno Sintético:	72
4.3. OBTENÇÃO DO EFLUENTE SUÍNO	72
4.3.1. Teste de Crescimento em Diferentes Fontes de Nitrogênio	75
4.3.2. Avaliação do Crescimento em Efluente Suíno Real	75
4.3.3. Determinações Analíticas Rotineiras	76
4.3.3.1. Determinação de Nitrito	76
4.3.3.2. Determinação de Nitrato	77
4.3.3.3. Determinação de Amônio	77
4.3.3.4. Determinação de Fosfato	77
4.3.3.5. Análise de Clorofila <i>a</i>	78
4.3.3.6. Análise de Carotenóides.....	79
4.3.3.7. Determinação da Biomassa.....	79
4.3.3.8. Determinação de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis	80
4.3.3.9 Alcalinidade total	81
4.3.3.10. Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	81
4.3.4. Análise Estatística dos Dados	81
4.3.5. Cálculos Realizados	82
4.3.5.1. Remoção de Nutrientes	82
4.3.5.2. Produtividade	82
4.3.5.3. Velocidade de Crescimento (K)	82
4.3.5.4. Consumo de Substrato (Fontes de Nitrogênio e Fósforo)	83
4.3.5.5. Fator de Conversão de Nitrogênio e Fósforo em Células ($Y_{X/N}$ e $Y_{X/P}$).....	83
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	85
5.1. Teste de toxicidade.....	85
5.2. Crescimento das microalgas em diferentes fontes de nitrogênio ..	86
5.3. Resultado da avaliação do crescimento das microalgas em efluente sintético	86
5.4. Caracterização do efluente real	91
5.5. Avaliação do crescimento das microalgas em efluente da suinocultura.....	92

5.5.1 Avaliação da Concentração de Biomassa e Clorofila <i>a</i>	94
5.5.2. Avaliação de Carotenóides	96
5.5.3 Avaliação da Remoção de Nutrientes (NH ₄ ⁺)	97
5.5.4. Avaliação da Remoção de Nutrientes (NO ₃ ⁻ e NO ₂ ⁻).....	99
5.5.5. Avaliação da Remoção de Nutrientes (PO ₄ ⁻³)	101
5.5.6. Velocidades de Crescimento e de Consumo de Nutrientes	102
6. CONCLUSÕES	105
7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS.....	107
8. REFERÊNCIAS	109
9. ANEXOS	129

1. INTRODUÇÃO

Com a atual situação mundial, mediada pelos impactos causados por inúmeros anos de agressão ao meio ambiente, é truísmo hoje reconhecer que a poluição está diretamente associada a problemas ambientais causados pela economia global. Esse cenário, fez com que a sociedade repensasse e avaliasse os principais erros cometidos, principalmente pelo setor industrial e essa preocupação virou atitude em busca de uma melhoria na qualidade de vida e qualidade ambiental, que será deixada de herança para a população.

A partir das preocupações sociais, leis ambientais tornaram-se mais restritas e a fiscalização tornou-se mais rigorosa. Contudo, a luta contra a poluição tornou-se uma questão importante em que a água, o ar e o solo se tornaram os principais focos desta ação sustentável. O aumento da poluição, industrialização e rápido desenvolvimento econômico impuseram sérios riscos à disponibilidade e qualidade dos recursos hídricos, não podendo ser eximidas as agroindústrias que contribuem para esta situação.

Assim inclui-se a suinocultura, reconhecida como uma importante atividade socioeconômica nacional, e considerada a quinta atividade em expansão no setor de exportações agrárias (MIELLE, 2006), como provedora e co-responsável pelo impacto ambiental causado pelas suas águas residuárias nas águas superficiais dos corpos d'água e subterrâneas. O principal causador dessa situação é o manejo inadequado dos resíduos da suinocultura que promove a contaminação de lençóis subterrâneos e rios através do processo de eutrofização, levando ao aumento da concentração de nutrientes. Já no solo ocasiona o aumento da população de patógenos e excesso de nutrientes e no ar emite gases poluentes (KUNZ et al., 2005).

Os resíduos provenientes da suinocultura apresentam elevada carga orgânica, altas concentrações de nitrogênio, fósforo, presença de sólidos em suspensão e dissolvidos, micro-organismos patogênicos, sais solúveis e metais pesados, principalmente cobre e zinco, além de uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Os principais responsáveis pela degradação do ambiente aquático de superfície são o fósforo, o nitrogênio e a alta DBO. O fósforo promove desequilíbrio dos ecossistemas através do processo de eutrofização das águas e a DBO causa redução do oxigênio dissolvido disponível, comprometendo a biodiversidade aquática (MULKERRINS et al., 2004). Já o nitrogênio oferece um risco maior em decorrência do processo de lixiviação no solo, contaminando as águas subterrâneas, pois, o amônio (NH_4^+),

presente nos dejetos, sofre oxidação até nitrato (NO_3^-), sendo pouco adsorvido nos solos e, com facilidade, é movido para águas superficiais e subterrâneas (KRAPAC et al., 2002).

Para tanto, com o intuito de mitigar os efeitos ao ambiente provocados pela atividade, as agroindústrias investiram no desenvolvimento de tecnologias capazes de minimizar o potencial poluidor das águas residuárias da suinocultura. Porém, até o momento não são viáveis do ponto de vista econômico, principalmente para pequenos e médios produtores (BORTOLI, 2010).

Desta forma, o setor carece de tecnologias de baixo custo que promovam não só a remoção de matéria orgânica, mas também os nutrientes presentes nestes dejetos. Neste sentido, o potencial do uso de microalgas visando o tratamento de resíduos e a utilização da biomassa destes microrganismos na suplementação alimentar de animais, vem sendo o foco dos estudos de muitos cientistas nos últimos anos, devido à identificação de diversas substâncias de alto valor nutricional que são sintetizadas por estes organismos, tentando agregar valor aos resíduos gerados nesta atividade.

A grande diversidade de microalgas e suas características fisiológicas tornam este grupo uma fonte potencialmente rica para a aplicação em diferentes setores da economia (OLAIZOLA, 2003). A partir da manipulação das condições de cultivo e notadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas até fármacos com elevados valores comerciais. Além da questão nutricional, os cultivos de microalgas podem ser aplicados para sequestrar dióxido de carbono, purificar efluentes e produzir bicomustíveis (DONG; ZHAO, 2004).

Embora o cultivo de microalgas seja assunto bastante desenvolvido nas suas mais diversas aplicações, muitos pontos ainda devem ser investigados para que se consiga utilizar de maneira satisfatória para o tratamento de efluentes. Haja vista que se tem buscado cada vez mais formas alternativas de se reduzir impactos ambientais de forma sustentável e economicamente viável.

Neste contexto, o presente trabalho visa contribuir para a avaliação do uso das espécies de microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Haematococcus pluvialis*, aplicadas à remoção de nutrientes do efluente proveniente de uma estação de tratamento de dejetos suínos em busca de alternativas para a

complementação dos sistemas de tratamento aeróbio e anaeróbios já existentes neste importante setor agroindustrial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento de três microalgas verdes *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Haematococcus pluvialis* para suas aplicações na remoção de nutrientes provenientes de efluentes finais de estação de tratamento de dejetos de suínos.

2.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar o crescimento das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em diferentes fontes de nitrogênio inorgânico, como amônio, nitrato e nitrito;
- Avaliar o crescimento das microalgas em diferentes concentrações do meio sintético suíno estéril (100%, 80%, 50% e 20%);
- Realizar o cultivo e analisar quantitativamente o crescimento das três espécies de microalgas, bem como a remoção dos nutrientes nitrogênio (amônio) e fósforo (fosfato) do efluente sintético a partir da concentração estipulada;
- Realizar o cultivo e analisar qualitativamente o crescimento das três espécies de microalgas, bem como a remoção dos nutrientes nitrogênio (amônio, nitrito e nitrato) e fósforo (fosfato) do efluente suíno real a partir das concentrações presentes;
- Identificar a melhor microalga para a remoção dos nutrientes nitrogênio (amônio, nitrato e nitrito) e fósforo (fosfato).

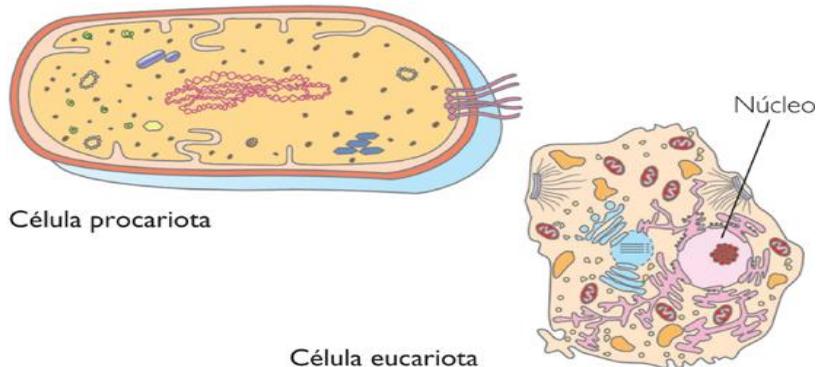
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ALGAS

3.1.1. Definição e Características

As algas correspondem a um grupo muito diverso de organismos, apresentando duas formas celulares básicas: procariotas e eucariotas. As células procariotas apresentam estrutura interna simplificada desprovida de organelas envoltas por membranas, este tipo celular é representado pelas cianobactérias, que correspondem a bactérias especializadas que possuem clorofila *a* (MADIGAN et al., 2004; LOURENÇO, 2006). Já os representantes eucariontes possuem células maiores e com maior complexidade estrutural, apresentando estruturas delimitadas por membranas, denominadas organelas, compreendendo a maioria dos indivíduos (MAGIGAN, 2004; LEE, 2008), conforme ilustrado na Figura 1. Apesar das diferenças entre os seus representantes, praticamente todos realizam o metabolismo fotossintético, devido à presença de clorofila *a* (SOUTH; HITTICK, 1987; MADIGAN et al., 2004).

Figura 1- Diferença das células procariota e célula eucariota



Por apresentarem estrutura simplificada, são considerados vegetais inferiores, denominadas por essa razão talófitas, ou seja, plantas que não apresentam vascularização, com ausência de raiz, caule e folhas (ASCENCIO, 2006), cuja diferenciação celular é pequena ou até mesmo inexistente. Como intitulam e designam organismos muito distintos entre si, quanto à sua origem, composição química e morfologia, o

termo “alga” não confere valor taxonômico ao grupo (RAVEN, 2007; LOURENÇO, 2006).

A partir das diferenças entre estes organismos, as algas podem ser divididas de diferentes formas: quanto ao número de células, unicelular ou pluricelular; bem como sua dimensão, sendo denominadas microalgas quando apresentarem dimensões microscópicas, correspondendo claramente à micro-organismos e as macroalgas, com dimensões macroscópicas, que podem atingir alturas superiores a 30 metros em espécies marinhas (MADIGAN et al., 2004; LOURENÇO, 2006). Seus representantes podem ser de vida- livres ou coloniais, e quando assumem um arranjo linear são denominadas filamentosas, podendo ser ramificados ou intrincados. Contêm clorofilas e por esse motivo possuem coloração esverdeada em sua maioria, dependendo do pigmento presente em abundancia podem exibir coloração marrom, vermelha entre outras (MADIGAN et al., 2004).

3.1.2. Microalgas

A grande maioria das espécies encontra-se no ambiente aquático, porém devido a sua grande diversidade, as microalgas podem ser encontradas em praticamente todos os nichos terrestres, inclusive em localidades que apresentam grandes variações físicas e químicas (LOURENÇO, 2006). Podem ser encontrados na superfície de neve, troncos de árvores, no solo e em associação simbiótica com os fungos (constituindo os líquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. Na maioria dos habitats apresentam a função principal de produtores primários da cadeia alimentar, graças ao processo fotossintético (RAVEN et al., 2007; LEE, 2008).

De acordo com Richmond (2004), acredita-se que exista mais de 30.000 espécies de microalgas, o que representa um recurso praticamente inexplorado. Cerca de 1.000 cepas são mantidas em coleções pelo mundo, entretanto, em torno de 50 espécies foram estudadas com detalhes, a nível fisiológico e bioquímico (OLAIZOLA, 2003).

O cultivo de microalgas é praticado há quase 140 anos, porém nas últimas décadas com o avanço e aprimoramento de tecnologias e ciências como fisiologia, microbiologia e as engenharias de maneira geral houve um avanço considerável na compreensão do potencial biotecnológico destes micro-organismos (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004).

As aplicações mais simples das microalgas correspondem ao uso na alimentação humana e de animais, devido ao elevado teor protéico. Outras aplicações baseiam-se na extração de substâncias de interesse comercial para a indústria farmacêutica, de cosméticos e alimentos, bem como o uso dos mesmos como indicadores ambientais, para o tratamento de águas residuárias, seqüestro de carbono e por fim produção de bicombustíveis (DERNER et al., 2006; CHIST, 2007; JACOB-LOPEZ et al., 2008; ABDEL-RAOUF et al., 2012).

3.1.3. Classificação

A classificação das algas é realizada por diferentes características, incluindo a natureza das clorofilas presentes, a estrutura da parede celular e o tipo de motilidade, quando existente. A característica mais empregada para a classificação dos organismos são os polímeros de reserva, resultantes da fotossíntese (MADIGAN et al., 2004). A partir da estrutura celular, as algas são distribuídas em divisões: Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta são as divisões procarióticas; Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta são os representantes eucarióticos. Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, esses são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo ao das plantas. A Tabela 1 apresenta as principais características de classificação dos grupos de microalgas.

Tabela 1- Propriedades dos principais grupos de algas.

Grupo de Algas	Nome Comum	Morfologia	Pigmentos	Representante Típico	Reserva	Parede Celular	Principais Habitat
Chlorophyta	Algas Verdes	Unicelular Folhosa	Clorofila a e b	<i>Chlamidomonas</i>	Amido	Celulose	Água doce, solos e marinhos
Euglenophyta	Euglenóide	Unicelular Flagelada	Clorofila a e b	<i>Euglena</i>	Paramilo	Ausência de Parede	Água doce e marinhos
Dinoflagellata	Dinoflagelados	Unicelular Flagelada	Clorofila a e c xantofila	<i>Gonyaulax Pfisteria</i>	Amido	Celulose	Principalmente marinhos
Chrisophyta	Diatomácea	Unicelular	Clorofila a e c	<i>Nitzschia</i>	Lipídeos	Dois componentes sobrepostos, compostos por sílica	Água doce, solos e marinhos
Phaeophyta	Algas Marrons	Filamentosa/ Folhosa pode ser maciça	Clorofila a e c xantofila	<i>Laminaria</i>	Lammarina	Celulose	Marinhos
Rhodophyta	Algas Vermelhas	Unicelular Filamentosa Folhosa	Clorofila a e d xantofila Ficocianina Ficoeritrina	<i>Polysiphonia</i>	Amido das florídeas	Celulose	Marinhos

Fonte: Adaptado de MADIGAN et al., (2004)

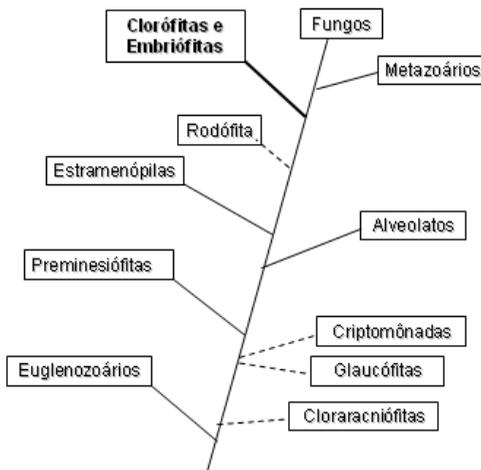
3.1.4. Divisão Chlorophyta

Chlorophytas ou algas verdes compreendem um amplo grupo de organismos que apresentam uma grande variabilidade morfológica, possuindo representantes microscópicos e macroscópicos em ambientes dulcícolas, salobros e marinhos. Apresentam cerca de 17.000 representantes, que estão divididos em quatro classes: Micromonadophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae (TOMASELLI, 2004). Embora sejam encontrados em ambientes tão distintos e diversos, cerca de 90% do total de espécies ocorrem predominantemente em água doce. São dotados de clorofila *a* e *b*, conteúdo também carotenóides e diferentes xantofilas, sua parede celular é semelhante às plantas superiores composta por celulose e obtém reserva através do amido (α - 1,4 glicano). São dotadas de pelo menos um plasto fotossintetizante, sendo estes envoltos por um envelope de duas membranas, sem retículo endoplasmático e no interior dos cloroplastos estão os tilacóides empilhados formando as granas (RAVEN, 2007; BONINI, 2012).

A reprodução vegetativa na maioria dos representantes ocorre por divisão celular simples e através da fragmentação de talos filamentosos, formas unicelulares podem se reproduzir também através de esporos, como no caso da *Chlamydomonas* (LOURENÇO, 2006). Já a reprodução sexuada é comum envolvendo isogamia, anisogamia e oogamia, ou seja, gametas morfológicamente iguais ou diferentes, sendo que a maioria é flagelado. Dependendo da classe do organismo é bastante comum encontrar diferentes ciclos de vida dentro de uma mesma divisão (LEE, 2008).

As clorófitas constituem o grupo mais semelhante às plantas superiores, devido à presença de estruturas em comum. Vários estudos moleculares indicam que os dois táxons Chlorophyta e Embriophyta, podem ser resumidos em um mesmo táxon monofilético, as Viridiplantae, (REVIERS, 2006; LOURENÇO, 2006). A partir da Figura 2, são demonstradas possíveis relações entre os grupos pertencentes aos eucariontes e onde seriam encontradas as algas.

Figura 2- Árvore filogenética demonstrando a relação entre as algas eucariontes e outros organismos eucariontes baseado pela codificação da subunidade menor do rRNA.



Fonte: Modificado de LOURENÇO (2006).

Por apresentarem semelhanças às plantas, a produção de microalgas pode ser justificada a partir de uma análise comparativa. Apresentam maior produtividade de biomassa por unidade de área, através da eficiente utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica; a natureza unicelular destes organismos permite que a biomassa apresente a mesma composição bioquímica; há facilidade da manipulação das condições de cultivo, como luz, temperatura e nutrientes; muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios, entre outros produtos de interesse (JACOB-LOPEZ et al., 2007; OHSE et al., 2009).

A diversidade cultural destes organismos representa uma importante característica tecnológica, possibilitando o cultivo de diferentes gêneros e espécies em uma ampla faixa de condições operacionais (SUBRAMANIAN; THAJUDDIN, 2005). A exploração comercial de algas verdes microscópicas compreende relativamente poucos gêneros, entre os quais os de maior interesse restringem-se a *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus* (TOMASELLI, 2004).

3.1.4.1 *Chlorella vulgaris*

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Chlorococcales

Família: Oocystaceae

Gênero: *Chlorella*

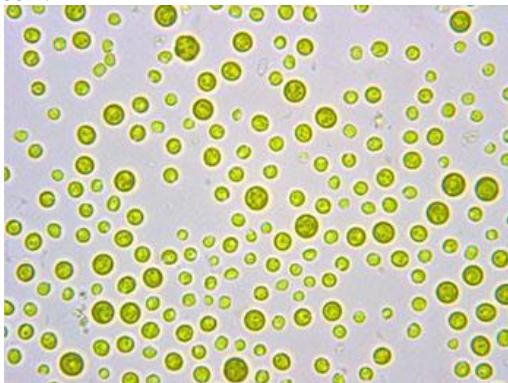
Espécie: *Chlorella vulgaris*

É uma microalga verde unicelular esférica ou elipsoidal de tamanho entre 2 e 4 μm , apresenta vacúolos contráteis, segundo Raven (2007), esta espécie é considerada uma Chlorophyceae unicelular não-móvel, conforme visualizado na Figura 3 (RODRIGUES, 2000). Na natureza a *C. vulgaris* está amplamente distribuída em água doce, salgada e no solo, cada célula desta microalga contém um único cloroplasto em forma de taça, com ou sem pirenóide e um único núcleo muitíssimo pequeno.

Esta microalga possui apenas o modo de reprodução assexuada, na qual cada célula haplóide divide-se mitoticamente duas ou três vezes para originar quatro ou oito células não-móveis (RAVEN, 2007), a divisão ocorre por ruptura ou dissolução da parede parental (RODRIGUES, 2000; RICHMOND, 1990). *Chlorella sp.* é a espécie mais importante na indústria de microalgas, sendo cultivada e vendida essencialmente como alimentos saudáveis (RICHMOND, 1990).

A substância mais importante produzida por esta microalga é a β -1,3 glucano, que possui efeito imunestimulador ativo, atua eliminando os radicais livres e reduzindo os lipídios do sangue (IWAMOTO, 2004). Outros efeitos foram observados, tanto como promotores da saúde ou como ação preventiva á doenças, conforme referenciado por Spolaore et al. (2006), porém a sua maior utilização é como aditivo alimentar.

Figura 3- Imagem da microscopia óptica das células de *Chlorella vulgaris* com aumento de 1000X.



3.1.4.2. *Scenedesmus quadricauda*

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Chlorococcales

Família: Scenedesmaceae

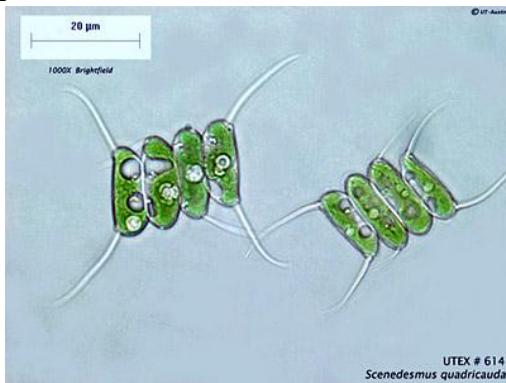
Gênero: *Scenedesmus*

Espécie: *Scenedesmus quadricauda*

Esta espécie pode ser caracterizada por indivíduos coloniais que vivem flutuando na água e possuem 2, 4, 8, 16 ou raramente 32 células dispostas linearmente dentro do cenóbio plano (Figura 4). Apresentam um tamanho variado de 8,2 a 19,6 μm de comprimento e de 2,4 a 8,2 μm de largura e possuem como característica a presença de um cloroplastídeo (BICUDO; MENEZES, 2006).

Este gênero representa um dos mais comuns e cosmopolitas de algas verdes e são encontrados com frequência em ambientes eutróficos e também são dominantes em lagos de água doce e rios (BOROWITZKA; BOROWITZKA, 1989). Uma variedade de microalgas aquáticas, incluindo a alga verde *Scenedesmus* sp., têm sido estudados para a sua possível eficácia como recursos biológicos para aplicações como alimentos para peixes, a alimentação humana, suplementares nutrientes humanos e de produtos farmacêuticos (BELAY et al., 1993), e também para a biorremediação de água poluída (CHONG et al., 2000).

Figura 4- Imagem da microscopia óptica das células de *S. quadricauda* com aumento de 1000X



3.1.4.3. *Haematococcus pluvialis*

Posição taxonômica da microalga *Haematococcus pluvialis* segundo Van den Hoek et al. (1997).

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Volvocales

Família: Haematococcaceae

Gênero: *Haematococcus*

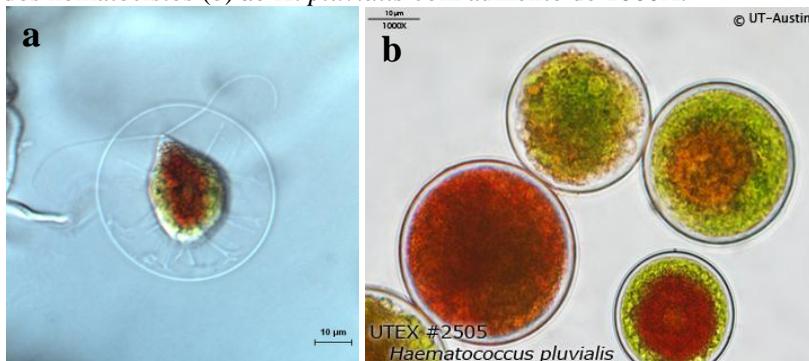
Espécie: *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis é uma microalga verde, móvel, unicelular com diâmetro de 15 a 20 μm , fotossintética e capaz de sintetizar e acumular o pigmento astaxantina em resposta às condições ambientais (DONG; ZHAO, 2004).

No decorrer do cultivo, quando as condições ambientais tornam-se adversas, como a escassez de nutrientes ou ocorre aumento da exposição à radiação solar, *H. pluvialis* entra em fase de resistência e forma cistos. Estes permitem a sobrevivência por longos períodos (GHIGGI, 2007), até que as condições voltem a ser favoráveis e as células retornam à forma vegetativa (CANTER-LUND; LUND, 1995).

Durante o ciclo de vida da *H. pluvialis*, esta apresenta 4 estágios ou tipos de células podem ser reconhecidos: microzoóides flagelados, macrozoóides flagelados, células palmelóides imóveis e hematocistos, os quais são grandes células vermelhas com uma parede celular altamente resistente (ELLIOT, 1934), conforme visualizado na Figura 5.

Figura 5- Imagens de microscopia óptica das células vegetativas (a) e dos hematocistos (b) de *H. pluvialis* com aumento de 1000X.



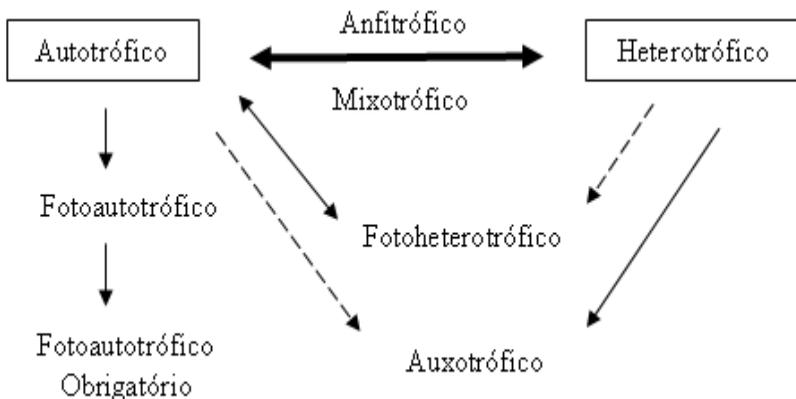
Esta clorófito é responsável pela produção do segundo carotenóide de maior interesse comercial, sendo a principal fonte natural de astaxantina. A partir dos anos 90 foi iniciado o cultivo em grande escala, sendo os maiores consumidores as indústrias de produção de ração para salmão, porém tem-se consumido também através encapsulados para o mercado de alimentos nutracêuticos. Seu valor atinge uma média de US\$ 3.000 por quilo (LOURENÇO, 2006).

O alto valor comercial da astaxantina natural dificulta a competição com o produto sintético, porém com o aprimoramento das tecnologias de cultivo a tendência é que ocorra uma diminuição e que assim o preço final seja repassado ao consumidor. Espera-se também que propriedades terapêuticas sejam confirmadas e que assim ocorra um interesse por parte da indústria farmacêutica, o que promoveria um aumento da demanda do produto (LOURENÇO, 2006).

3.2. METABOLISMO

Microalgas possuem uma versatilidade no que se refere à manutenção de suas estruturas, usufruindo diferentes metabolismos energéticos, como a respiração, fotossíntese ou fotorespiração e fixação de nitrogênio, sua utilização depende inicialmente da origem evolutiva e também das condições ambientais ou das condições de cultivo, como demonstrado na Figura 6 (GROBBELAAR, 2004).

Figura 6- Possíveis metabolismos realizados pelas algas.



Fonte: Adaptado de GROBBELAAR (2004).

A partir do uso da fonte de carbono, podemos distinguir dois tipos básicos de nutrição por microrganismos: autotróficos ou heterotróficos. Os autotróficos obtêm todos os elementos necessários para seu crescimento através de compostos inorgânicos, enquanto que os heterotróficos necessitam de substratos orgânicos sintetizados por outros organismos. Entre os autotróficos existem os fotoautotróficos, os quais obtêm energia para o metabolismo da luz e os heteroautotróficos ou quimioautotróficos, os quais obtêm energia para o metabolismo proveniente de compostos inorgânicos ou íons (BORGHETTI, 2009).

Como mencionado anteriormente, a fotoautotrofia envolve a utilização da luz como única fonte de energia, a qual é convertida em energia química pelo processo de fotossíntese. Nestas condições de cultivo, há uma relação direta entre a atividade fotossintética e o crescimento do micro-organismo, já que a luz é o substrato e sua intensidade influencia na taxa específica de crescimento, podendo ser descrito através do modelo de Monod, sendo possível identificar ou não a foto-inibição (HATA et al., 2000; BONINI, 2012).

Para alguns autores como Eriksen (2008) e reforçado por Bonini (2012), os cultivos fotoautotróficos apresentam uma produtividade limitada, já que é necessário que haja uma conversão da energia luminosa em biomassa, sendo que para isso a fonte de luz e a eficiência fotossintética estão relacionadas. Para tanto é preciso que ocorra um equilíbrio, pois sob baixa iluminação a energia disponível é insuficiente,

enquanto que a elevada iluminação pode provocar foto-inibição (YAN et al., 2011).

Na presença de moléculas orgânicas, como açúcares, ácidos orgânicos e acetato algumas microalgas e cianobactérias são capazes de usar o metabolismo heterotrófico no escuro (JACOB-LOPEZ et al., 2007). Assim sendo, o metabolismo consiste na substituição do CO₂ atmosférico dos cultivos autotróficos, por fontes de carbono adicionadas, o que possibilita o aumento da concentração de biomassa e da produtividade.

Além dos metabolismos citados, é comum observar outro processo metabólico, o mixotrófico. Este equivale ao autotrófico e heterotrófico, onde ambos os compostos orgânicos e o CO₂ são necessários para o crescimento, operando simultaneamente, o respiratório e fotossintético (GROBBELAAR, 2004), porém a realização da fotossíntese é sua principal fonte de energia. Contudo, os organismos mixotróficos assimilam compostos orgânicos como fonte de carbono, enquanto utilizam compostos inorgânicos como doadores de elétrons (LEE, 2004).

Um subtipo de mixotrofia pode acontecer segundo Lourenço (2006), sendo denominado anfitrófico, ou seja, os organismos são capazes de viver através do metabolismo autotrófico ou heterotrófico, dependendo da concentração de compostos orgânicos disponíveis e da intensidade luminosa do ambiente em que se encontram.

Para Heredia- Arroyo et al. (2010), os cultivos heterotróficos e mixotróficos de microalgas são menos estudados que o metabolismo convencional. Este fato seria justificado pela adição de uma fonte de carbono, que poderia competir com substratos para a dieta humana. Para solucionar esta questão devem-se pesquisar espécies capazes de crescer a partir de fontes de carbono simples ou que usem como substratos de resíduos agro-industriais, como no caso do presente trabalho.

3.2.1. Fotossíntese

A captação da energia solar pelos organismos fotossintéticos e sua conversão em energia química nos compostos orgânicos reduzidos é a fonte fundamental de quase toda a energia biológica (NELSON; COX, 2000). Este processo pode ser considerado o responsável por liberar oxigênio e consumir dióxido de carbono, tornando o ambiente habitável até os dias atuais.

A fotossíntese representa um processo único de conversão de energia solar, em que os compostos inorgânicos na presença de energia

de luminosa são convertidos em compostos orgânicos por organismos fotoautótrofos. Eles usam a energia da luz para extrair prótons e elétrons a partir de uma variedade de moléculas, tais como doadores de H_2S , para reduzir o CO_2 e formar moléculas orgânicas (MASOJIDEK et al., 2004).

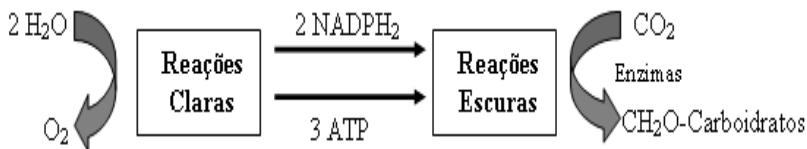
No caso de algas e plantas verdes, que utilizam a água como doadora de elétrons, a produção de glicose é representada pela equação total da fotossíntese. Esta descreve uma reação de oxidação-redução onde a H_2O doa elétrons (como hidrogênio) para a redução do CO_2 até o carboidrato (CH_2O), desta forma a reação global de fotossíntese pode ser assim descrita:



Apesar da equação acima descrita parecer simples, o processo é bem complexo. Porém de maneira simplificada, a reação de fotossíntese abrange dois processos, as reações luminosas, que ocorrem na presença de luz e as reações de fixação do carbono, também conhecida erroneamente como reações do escuro, já que existem enzimas que dependem diretamente da luz para realizarem esta etapa (NELSON; COX, 2000).

Na reação luminosa, a clorofila e outros pigmentos absorvem a energia solar e a conservam na forma química de ATP e NADPH; simultaneamente o O_2 é produzido e liberado. Nas reações de fixação de carbono, o ATP e o NADPH são usados para reduzir o O_2 , que ocorre apenas na luz e a redução do CO_2 , que não requer luz, sendo assim os dois processos são distintos (MASOJIDEK et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). O esquema da Figura 7 demonstra as etapas da fotossíntese e seus produtos.

Figura 7- Principais produtos das reações claras e escuras da fotossíntese.



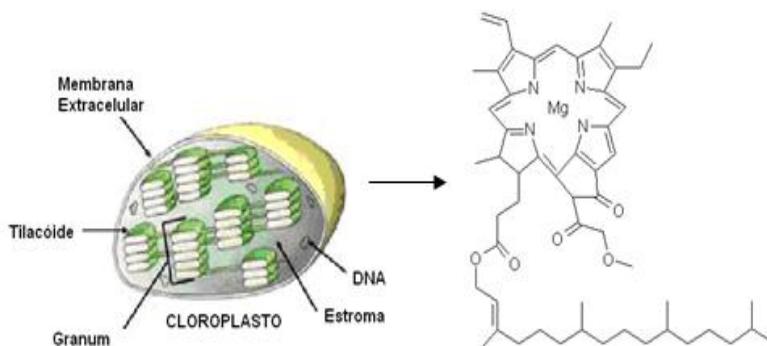
Fonte: Adaptado de MASOJIDEK et al. (2004).

O processo de fotossíntese aeróbica é dividido em duas etapas, reações claras e reações escuras. As reações claras incluem a absorção de luz, a transferência de elétrons e translocação de prótons, resultando

na produção de NADPH_2 , ATP e O_2 . Na outra fase, as reações acontecem no estroma e representam a redução do CO_2 e a síntese de hidratos de carbono, usando o NADPH_2 e ATP produzido nas reações de luz, ocasionando em um aumento da biomassa das microalgas.

Raven et al. (2007) citam que as reações de captação da luz ocorrem nas membranas internas dos cloroplastos, conhecidas como tilacóides, onde são encontradas a clorofila e outros pigmentos, como carotenóides e ficobilinas. Os tilacóides têm a forma de discos empilhados, seu conjunto recebe o nome de grana. Os tilacóides de diferentes grana são interconectados pelos tilacóides do estroma. A série de reações nas quais a energia captada da luz é utilizada para a síntese de compostos contendo carboidratos ocorre no estroma, material que envolve os tilacóides. A Figura 8 possibilita obter uma visão do cloroplasto com os seus constituintes, enfatizando a molécula de clorofila a, que a principal responsável pela captação da energia solar.

Figura 8- Visão de um cloroplasto e seus componentes, focando para a molécula de clorofila a, com estruturas policíclicas planas e um átomo central de magnésio (Mg).



De acordo com Raven et al.(2007) a energia luminosa só pode ser utilizada depois de absorvida pelos pigmentos fotossintéticos na faixa do espectro de luz que compreende de 400 a 700 nm. Os pigmentos se encontram em dois fotossistemas, FS I e o FS II, assim, quando iluminados promovem a passagem dos elétrons da água para o NADPH, ocorrendo uma série de reações nos tilacóides dos cloroplastos.

Desde o momento da absorção da luz pelo FS I, muitas transferências de elétrons ocorrem, passando por proteínas e coenzimas até que ocorra a redução para a formação do produto de interesse, o

NADPH. A perda de elétrons faz com que estes sejam transferidos ao FS II por uma cadeia transportadora de elétrons semelhante a que ocorre nas mitocôndrias durante o processo respiratório. Quando os elétrons são extraídos da água e são dissociados em prótons e O_2 , ocorre o processo de fotoxidação da água. Com a formação de uma bomba de prótons, induz-se a passagem de H^+ pela membrana até que o ATP seja formado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A etapa escura é caracterizada pelo processo de assimilação do carbono, formando as moléculas de carboidratos. Estas são formadas a partir do ciclo de Calvin, ou seja, uma série de reações químicas onde o CO_2 é fixado e seus átomos são usados na montagem de moléculas maiores. Neste processo há gasto de ATP e NADPH obtidos na fase clara.

Durante este processo, a ribulose bi-fosfato é responsável pela produção de duas moléculas de fosfoglicerato a partir da reação com o CO_2 . O fosfoglicerato é composto por um átomo de fósforo e por uma cadeia de três carbonos (ligados a oxigênios e hidrogênios) chamada de glicerol. A enzima relacionada a esta etapa é conhecida pela sigla RUBISCO, que significa ribulose bi-fosfato carboxilase. Com os produtos formados na etapa anterior, uma das moléculas de fosfoglicerato usada para produzir as moléculas de carboidratos e a outra retornará ao ciclo e será usada para restabelecer a molécula de ribulose bi-fosfato gasta no seu início.

A adaptação de diferentes espécies de microalgas a uma ampla faixa de concentração de dióxido de carbono está relacionada com um processo biofísico essencial denominado de mecanismo de concentração de carbono (CCM), que concentra o dióxido de carbono nos sítios de carboxilação fotossintéticos. Estes mecanismos envolvem vias metabólicas complexas, já que variadas formas de carbono inorgânico estão envolvidas nos processos biológicos (JAISWAL; KASHYAP, 2002).

As células das microalgas são capazes de utilizar três diferentes vias de assimilação de carbono inorgânico: (1) assimilação direta do dióxido de carbono através da membrana plasmática; (2) utilização de bicarbonato através da indução da enzima anidrase carbônica, que converte os íons HCO_3^- em CO_2 ; (3) transporte de bicarbonato diretamente através da membrana plasmática. As enzimas anidrase carbônica e ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/desidrogenase são as responsáveis pela biocatálise destas reações, no qual a enzima anidrase carbônica supre a rubisco através da conversão de bicarbonato em

dióxido de carbono, que usa este composto como substrato gerando fosfoglicerato (JACOB-LOPEZ, 2007).

3.2.2. Nutrientes

Alguns componentes são de grande importância para o desenvolvimento de um cultivo, devendo ser acrescentados em menores ou maiores quantidades nos meios de cultura para obter um melhor desenvolvimento das espécies. Além de identificar o que é fundamental, é possível avaliar o grau de necessidade ou não de outros compostos, sendo que estes podem ser removidos sem causar prejuízos para os organismos (GROBBELAAR, 2004).

O meio de cultivo influencia diretamente no crescimento celular, bem como na composição química da microalga que está em estudo, assim sendo, considera-se a composição celular média das algas iguais a $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P_1$ (CRAGGS, 2005). Observando a composição celular microalgal é possível identificar os componentes mais importantes para a sua manutenção, como carbono, nitrogênio, fosfato e em menores quantidades os sais de magnésio, potássio, cálcio denominados microelementos como manganês e cobalto que atuam favoravelmente em atividades vitais (LIMA et al., 1999).

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações, pois constituinte básico para a formação de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pela célula, como: proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídeos (LOURENÇO, 2006). A necessidade de carbono está relacionada com o tipo de cultivo utilizado, para altas taxas de produção autotrófica, o fornecimento de CO_2 e HCO_3^- é mais importante. Para considerar apenas o CO_2 presente na atmosfera, deve-se levar em consideração a taxa de difusão do gás em meio aquoso, obtendo-se uma produtividade limitada que deve ser considerada (GROBBELLAR, 2004).

O nitrogênio assume um papel de destaque, pois é um dos principais elementos do metabolismo dos ecossistemas aquáticos, principalmente devido a sua participação na formação de proteínas, sendo este um componente importante da biomassa. As principais fontes de nitrogênio são as fontes inorgânicas, como o nitrato, nitrito e amônio e as fontes orgânicas, uréia, aminoácido livre e peptídeos (PADISÁK, 2004; GUIMARÃES, 2009). Este é incorporado dentro do microorganismo na síntese de proteínas, sendo que sua ausência acarretaria a diminuição de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor protéico (REINEHR, 2003).

O fósforo é outro macronutriente que desempenha um papel importante nos processos metabólicos celulares, formando muitos componentes estruturais e funcionais necessários para o crescimento normal e desenvolvimento de microalgas, representa cerca de 1% de peso seco celular (GOLDMAN, 1981). O ortofosfato é incorporado em componentes orgânicos através de vários tipos de fosforilação, bem como o fosfato inorgânico que também pode ocorrer nas células sob a forma de polifosfatos, acumulando grânulos distintos. Estes grânulos celulares de polifosfato muitas vezes aparecem nas células normais, quando há fosfato suficiente para o crescimento, mas desaparecem quando o fosfato se torna deficiente (HEALEY, 1982; HU, 2004).

O crescimento de algas e absorção de nutrientes não são afetados apenas pela disponibilidade de nutrientes, eles também dependem de interações complexas entre fatores físicos, tais como pH, intensidade luminosa, temperatura (TALBOT; DE LA NOÛE, 1993), e fatores bióticos. Um dos fatores bióticos que pode influenciar o crescimento de algas é a densidade inicial, espera-se que uma maior densidade de algas acarretará em um melhor o crescimento e assim uma maior eficiência de remoção dos nutrientes (LAU et al., 1995). No entanto, uma elevada densidade algal conduziria a auto-sombreamento que pode acumular auto-inibidores que reduzem a eficiência fotossintética (ABDEL-RAOUF, 2012).

3.2.3. Assimilação de nitrogênio e fósforo

O processo de assimilação consiste em uma seqüência de reações de redução mediadas por complexos enzimáticos, que conduzem a incorporação do elemento, geralmente na forma de íons orgânicos, á substâncias orgânicas da célula (LAVIN; LOURENÇO, 2005).

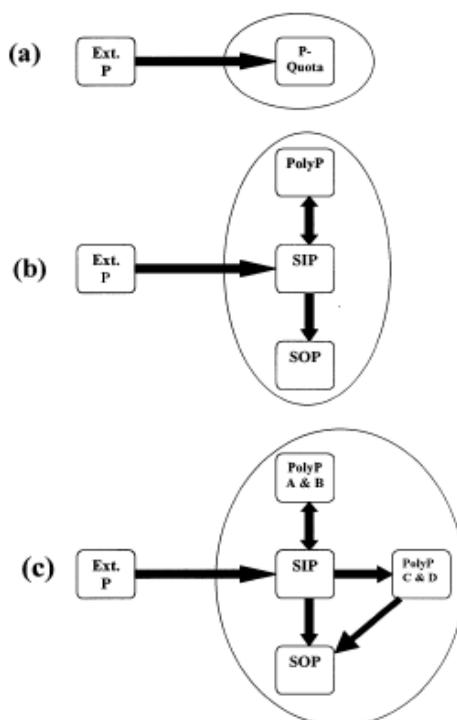
Para o nitrogênio entrar na célula deve ultrapassar a barreira permeável da membrana citoplasmática. O composto nitrogenado nitrato, em baixas concentrações, é captado por um transportador de elétrons de grande afinidade, enquanto que em altas concentrações o processo ocorre por difusão passiva. Já as baixas concentrações de amônio são captadas por uma permease que catalisa um processo transporte ativo potencial, dependente da membrana. Porém em altas concentrações este processo é inibido e o transporte ocorre por difusão passiva, sendo que todo o nitrogênio assimilado é convertido em amônio celular (KOLONDNY et al., 2006; GUIMARÃES, 2009).

Microalgas contêm tipicamente cerca de 1% de fósforo, em massa seca (KAPLAN et al., 1986), mas sob certas condições as microalgas

tendem a reservar muito mais que o fósforo é necessário para a sobrevivência. Este fósforo extra é armazenado como polifosfato para utilização como um recurso interno quando a concentração externa de fósforo é limitante (KUHL, 1974).

A Figura 9 mostra três modelos identificados para a nutrição-P, estas vão desde a forma simples através da diferença de concentração (Fig. 1a), passa por um segundo modelo com três intermediários, em que o fosfato inorgânico solúvel (SIP), polifosfato (pólipo) e P estrutural e orgânico (SOP) – (Fig. 1b), e por fim a forma que representa a complexidade da realidade (Fig. 1c) (MIYACHI et al., 1964).

Figura 9- Representação esquemática para três modelos de alternativas de transporte e assimilação de P (a) modelo convencional contendo um único alternativa para o nutriente (b) modelo para diferentes tipos de fósforo, o inorgânico (SIP), e o polifosfato e o orgânico solúvel (SOP) (c) esquema proposto por MIYACHI et al. (1964), com duas alternativas distintas, sendo que em uma o SOP é sintetizada diretamente.



Fonte: Adaptado de JOHN; FLYNN (2000).

3.3. Condições de cultivo

As condições limitantes para o cultivo de microalgas estão relacionadas principalmente com as características do ambiente e da cultura. Para avaliar, é importante compreender a importância e os efeitos de cada variação durante o cultivo, tais como: pH, salinidade, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, aeração, presença de íons bicarbonato, fonte de nitrogênio, tipo de biorreator, idade do inóculo, concentração inicial de biomassa, densidade populacional (KITAYA et al., 2005; BEREGUEL et al., 2004; MOLINA GRIMA et al., 1999).

Quanto ao regime de cultivo, podemos classificar como três os principais, entre eles:

Cultivos em batelada ou estanques são caracterizados por apresentar intensas modificações na composição do meio durante o cultivo e pelo efeito de sombreamento causado pela concentração celular com o passar do tempo. Neste cultivo existem fases bem estabelecidas do crescimento celular, entre elas: *fase lag* que representa uma etapa de adaptação celular; *fase exponencial ou logarítmica*, onde ocorre a duplicação do número celular; na *fase de desaceleração* ocorre uma diminuição da velocidade de crescimento, causando a cessação do crescimento; *fase estacionária* representa a fase em que se atinge o rendimento final máximo, ocorrendo uma constância no número celular e por fim a *fase de declínio*, onde há consumo endógeno que promove a parada do crescimento.

O processo de cultivo contínuo representa permanentemente a saída de cultura com células das microalgas e a entrada de meio esterilizado no local de cultivo, neste processo é observado o crescimento balanceado das microalgas, em que as células são mantidas em estado exponencial, para tal condição, geralmente são realizados com iluminação constante. O acompanhamento de medidas de crescimento e de consumo de nutriente bem como outros fatores que podem influenciar no cultivo auxilia na determinação das condições experimentais. Este tipo de cultivo requer alguns dias ou até mesmo semanas para que seja estabilizado e assim ocorra um equilíbrio entre a produção de biomassa e a entrada do meio de cultivo. Devido ao seu alto custo, este regime só era utilizado em pesquisa, porém com o avanço das tecnologias já é possível encontrá-lo em nível de escala comercial.

Por fim, pode ser encontrado um último processo denominado semicontínuo, este propicia uma grande produção de células por

intervalo de tempo. Para tal, uma quantidade de meio de cultivo é removida, porém sem células do cultivo e adiciona-se a mesma quantidade de meio novo. Neste modelo de crescimento são observadas variações bruscas da concentração celular no cultivo, o fundamento principal deste sistema é que é possível obter células em bom estado fisiológico, não havendo limitações por porte de escassez de nutrientes.

Este processo é realizado com frequência tanto na pesquisa, quanto em escala comercial, porém as espécies escolhidas para o cultivo devem ser resistentes às variações do meio de cultivo, com altas e baixas concentrações de nutrientes (LOURENÇO, 2006).

3.3.1. Intensidade Luminosa

A disponibilidade e intensidade da luz, bem como a duração dos ciclos são um dos principais fatores que controlam a produtividade de cultivos fotossintéticos (SICKO-GOAD; ANDRESEN, 1991; LEE; LOW, 1992). Pulz e Scheinbenbogen (1998) reportam que a atividade fotossintética se eleva com o aumento da irradiação até determinados valores, posteriormente começa a ocorrer inibição do crescimento celular, através de um fenômeno conhecido por fotoinibição.

Segundo estes autores, este fato está relacionado à saturação do aparato fotossintético dos microrganismos e tem sido observada nas horas centrais dos períodos luminosos em cultivos abertos e ainda em cultivos fechados com controle da luminosidade, em situações em que as concentrações celulares são baixas, como é o caso de start-up dos processos (GÖKSAN et al., 2003; REBOLLOSO-FUENTES et al., 1999).

Além destas características, o fotoperíodo, ou seja, a relação entre a duração dos ciclos de luz e escuro causa severas alterações nas taxas fotossintéticas. Este fato, torna-se relevante à medida que o uso destas rotas metabólicas em processos de engenharia ambiental requer a utilização da energia solar, a fim de desenvolver processos de tecnologia limpa. Desta forma, as células utilizariam a energia luminosa através de reações exergônicas, as quais seriam utilizadas na síntese de compostos a partir da fixação de dióxido de carbono através de reações endergônicas.

Um dos problemas operacionais deste tipo de tecnologia refere-se à indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo. Por outro lado, algumas linhagens quando submetidas a condições de ausência de luminosidade, podem imediatamente utilizar o metabolismo heterotrófico para a manutenção de suas estruturas, no qual há a

liberação de dióxido de carbono em detrimento a assimilação, o que é altamente desfavorável do ponto de vista do seqüestro de carbono (ACIÉN-FERNÁNDEZ et al., 2005).

Além do fotoperíodo, outros fatores contribuem para um melhor crescimento microalgal, entre eles, a intensidade e a qualidade luminosa. Assim, tanto a intensidade quanto a qualidade luminosa estão relacionadas ao comprimento de onda que as microalgas estão expostas, sendo que a variação da luz no espaço (profundidade e latitude) e no tempo (diariamente e sazonalmente) implica ser este um fator condicionante no crescimento. A qualidade do espectro luminoso e a irradiação causam distintos efeitos no crescimento e, especialmente, na composição bioquímica das espécies de microalgas estudadas, principalmente quanto ao teor de polissacarídeos, proteínas e clorofila (DERNER, 2006).

Para avaliar a qualidade do espectro luminoso, recentes progressos relacionados à pesquisa da fluorescência têm sido obtidos após construção dos fluorímetros modulados (FLM), que possibilitam monitorar a fluorescência na frequência e fase da luz modulada de excitação (1 a 100 kHz), em conjunto com um sistema de detecção de fluorescência. Estes aparelhos permitem monitorar a fluorescência na presença de uma luz contínua de qualquer comprimento de onda, incluindo a luz solar, captando comprimentos de ondas entre 400 e 720 nm, faixa do espectro visível em que a ocorre a radiação fotossinteticamente ativa (DERNER, 2006).

3.3.2. Disponibilidade de Carbono

A disponibilidade de CO₂ é um fator determinante para o desempenho da cultura celular, já que o dióxido de carbono é a principal fonte de carbono em cultivos fotossintéticos. De acordo com Cheng et al., (2006), a concentração de dióxido de carbono na corrente de ar de um fotobiorreator é um parâmetro determinante, já que a concentração deste composto não deverá ser excessivamente baixa, limitando a disponibilidade de carbono às células, porém não deverá exceder um limite superior que cause perdas de CO₂ para a atmosfera, resultando em uma poluição ambiental desnecessária. Além disso, Kitaya et al., (2005), demonstram o efeito adverso causado por elevadas concentração de dióxido de carbono no desenvolvimento celular.

3.3.3. pH

A faixa de pH considerada ótima para a fotossíntese situa-se entre 7,5 e 10, estando os limites mínimos entre 6,5 e 7,0 (VALIENTE; LEGANES, 1989). Muitas espécies crescem em ambientes que variam de neutro a alcalino, porém o pH é um fator que afeta diretamente a distribuição e o crescimento de microalgas.

A dissolução do dióxido de carbono na fase aquosa de fotobiorreatores contribui para o controle do pH das culturas (BERENGUEL et al., 2004). O incremento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre devido à atividade biológica das células que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular, forçando um deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão. Além disso, o pH do meio de cultivo irá determinar as formas de carbono inorgânico (CO_2 , CO_3^{-2} ou HCO_3^-) dissolvida na fase líquida (CUARESMA et al., 2006; JACOB LOPEZ, 2007).

Segundo Lee, Apel e Walton (2006), a elevação do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico pelo crescimento celular. Dentre os fatores mais importantes no cultivo de algas, destaca-se o pH do meio de cultivo que também determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, o que, direta ou indiretamente, influencia o metabolismo das algas.

A variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, solubilização e consumo do dióxido de carbono, e à degradação de metabólitos produzidos (GRIMA et al., 1999).

3.3.4. Temperatura

Um dos principais fatores para o crescimento de todos os organismos vivos é a temperatura, que além de influenciar nas taxas de reações celulares afeta também a natureza do metabolismo, a concentração de biomassa, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa (FAINTUCH, 1989).

A temperatura ótima para o crescimento de microalgas e cianobactérias, situa-se geralmente entre 25°C a 35°C (GROSSMAM et al., 1994). O efeito da temperatura nas características fisiológicas de cada espécie possui relação inversamente proporcional com a dissolução do dióxido de carbono, representando uma limitação aos processos de transferência de massa nestes sistemas.

Dois fatores são os responsáveis pelo efeito da temperatura no crescimento e na atividade da biomassa: um é a ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (proteínas e lipídios) e o outro é uma relação dos coeficientes cinéticos com a temperatura, os quais dependem das energias de ativação das reações.

3.3.5. Agitação e aeração nos cultivos

A aeração é um fator muito importante para a homogeneização dos nutrientes e para evitar a sedimentação das microalgas. Em cultivos de grande escala é recomendada a injeção de CO₂ para contribuir ao processo de fotossíntese. A concentração de O₂ nos tanques de cultura representa um bom parâmetro para se controlar a atividade fotossintética das microalgas, assim sendo quando se aumenta a atividade fotossintética a concentração de O₂ pode aumentar rapidamente, inibindo o processo da fotossíntese, favorecendo a fotoxidação (RICHMOND, 1990) o que pode ocasionar danos na morfologia celular, bem como a morte da cultura em estudo (FAINTUCH, 1989).

A injeção de ar aos cultivos proporciona uma difusão efetiva dos nutrientes, um aporte parcial de CO₂ inorgânico, uma estabilidade do pH, a manutenção das algas em suspensão e o cultivo uniformemente distribuído (COLLA et al., 2002). Estes mesmos autores afirmam que cultivos em volumes de um litro ou menos não necessitam aeração, basta que se realize uma agitação manual diariamente, porém nos cultivos de grande escala é recomendado o início da aeração na fase de indução, que corresponde ao período de até dois dias depois da inoculação

Fast e Boyd (1992) afirmam que a aeração mecânica se faz necessárias, principalmente, nas seguintes condições: durante a noite, devido à alta taxa de respiração das microalgas; quando as microalgas não são saudáveis (enfermas ou muito velhas), o que origina uma menor produção de oxigênio e um alto risco de morte repentina de toda a biomassa; durante a falta ou carência de luz, pois com pouca radiação (solar ou artificial), diminui substancialmente a produção de oxigênio inibição da fotossíntese e assim promove a inibição da fotossíntese.

3.4. Suinocultura

A suinocultura representa uma importante atividade sócio-econômica, que propicia renda e emprego em vários setores da economia mundial. O Brasil assume participação fundamental na

produção mundial de suínos, ocupando o quarto lugar com uma produção estimada de 3 milhões de toneladas, representando cerca de 11% do total de exportações de carne suína mundial, sendo o quarto maior exportador com 530 mil toneladas de carne o sexto maior consumidor de carne suína (MIELE; MACHADO, 2010). Atualmente no país esta cultura apresenta posição de destaque frente ao agronegócio nacional, sendo o quinto setor com maior expansão nas exportações, com aumento de 9,04 %, comparado o mesmo período de 2008 e de 2009 (BARROS, 2009).

No Brasil, a suinocultura é explorada de duas formas diferentes. A primeira concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste responsável por 90% da produção brasileira, que é tecnificada, com altos índices de produtividade, entre os melhores do mundo. A outra forma de suinocultura, predominante nas regiões Norte e Nordeste, são rústicas e possuem baixos índices de produtividade e sanidade (NOGUEIRA; SILVA, 2006; SILVA, 2006).

Os três estados da região sul do país, Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul são os principais produtores de suínos. Porém, dentro destes, Santa Catarina é o estado de maior expressão da suinocultura tecnificada na economia nacional, o que promoveu efeitos multiplicadores de renda e geração de emprego para milhares de famílias de forma direta ou indireta em várias ramificações da cadeia de produção de proteína animal (HADDAD et al., 1999; MIRANDA; COLDEBELLA, 2002).

A região oeste catarinense destaca-se apresentando o maior complexo agroindustrial de suínos e aves do país. Esta produção caracteriza-se pelo trabalho familiar, distribuídas em pequenas propriedades rurais que são responsáveis por 75,8% do efetivo de suínos (IBGE, 2009). Segundo Rodrigues (2000), a produção de suínos é caracterizada pelo confinamento intenso em unidades restritas, com aumento da escala de produção dos animais. A vantagem associada a este tipo de produção constitui nos baixos custos da produção e da logística, apesar das vantagens associadas a estes sistemas, à medida que a escala de produção aumenta, crescem também a quantidade de dejetos lançados ao meio ambiente e assim geram-se os problemas ambientais (PEREIRA et al, 2010; BORTOLI, 2010).

3.4.1. Problemas Ambientais associados à suinocultura

Os problemas vinculados às atividades suinícolas estão associados às grandes perdas de nutrientes em decorrência da digestão limitada por

parte dos animais, sendo eliminadas através das fezes, urinas e dos gases. Os principais impactos causados ao meio ambiente são decorrentes do grande volume de dejetos gerados pelos suínos, que variam de acordo com a fase de crescimento, alta concentração de nutrientes presentes nas águas residuárias e do manejo impróprio dos dejetos de suínos (KUNZ, 2009).

Os dejetos provenientes do cultivo suíno constituem uma fonte poluidora que exige atenção, já que contribui para os baixos índices de qualidade ambiental quando não tratados de maneira adequada. Assim, os dejetos dos animais não tratados, lançados no solo e nos mananciais de água, podem causar desequilíbrios ambientais, dispersar patógenos, eutrofizar águas superficiais, desequilibrar macro e micro nutrientes no solo e gerar impactos por antibióticos e desinfetantes sobre a comunidade microbiana do solo (DETTMER, 2003).

O manejo inadequado dos resíduos da suinocultura como o extravasamento de esterqueiras e a aplicação excessiva no solo, pode ocasionar a contaminação de rios como a eutrofização, de lençóis subterrâneos levando ao aumento da concentração do íon nitrato, do solo com o aumento da população de patógenos e excesso de nutrientes, e do ar como emissões de gases poluentes (KUNZ et al., 2005).

A constituição química e orgânica dos dejetos é muito variável, assim sendo as águas residuárias produzidas apresentam essa variação de maneira mais acentuada, já que este é influenciado pelo manejo e a quantidade de água utilizada no processo. Porém de maneira geral, os dejetos de suínos apresentam concentrações elevadas de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sólidos em suspensão e macronutrientes, como o nitrogênio e o fósforo (DARTORA et al., 1998).

Segundo SCHÄFER (1985), o acúmulo de nutrientes nas águas naturais causa o processo de eutrofização, que com o enriquecimento de nutrientes estimula o crescimento e a multiplicação de algas e de outros vegetais aquáticos. Tais condições propiciam efeitos adversos como formação de toxinas proveniente das algas e resíduos, problemas de odor, morte de peixes, efeitos nocivos à saúde humana, diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD), dificultando a autodepuração do corpo receptor.

Saraiva (2000) relata que o nitrogênio contém muitos estados oxidativos e pode ser encontrado sob muitas formas no ambiente e que as reações de troca de um estado de oxidação para outro podem ser realizadas por organismos vivos. Assim, este composto pode ser

observado conforme segue: N (-III) em NH_3 (NH_4^+); N(III) em nitritos (NO_2^-), e N(V) em nitratos, NO_3^- , bem como N(0) em N_2 e em outras formas, como em óxidos nitroso (N_2O) e nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2). Apesar de apresentar diferentes formas, as mais estáveis e mais comuns no meio ambiente são NH_4^+ e a forma mais oxidada NO_3^- , ambas com alta solubilidade em água (BAILEY et al., 2002).

As principais fontes de nitrogênio para organismos pertencentes ao fitoplâncton constituem as fontes inorgânicas que são compostas por nitrato, nitrito e amônio, e as fontes orgânicas que são uréia, aminoácidos livres e peptídeos, além do dinitrogênio atmosférico que é utilizado pelas fixadoras de nitrogênio (PADSÁK, 2004).

Já o fósforo pode apresentar três diferentes formas nas águas, os fosfatos orgânicos que constituem moléculas orgânicas, os ortofosfatos representados pelos radicais PO_4^{-3} , HPO_4^{-2} e H_2PO_4^- que podem combinar com cátions formando sais inorgânicos nas águas e por fim os polifosfatos ou fosfatos condensados que formam os polímeros de ortofosfatos. No entanto, esta terceira forma não requer atenção especial para o controle de qualidade das águas, pois os polifosfatos sofrem hidrólise, convertendo-se rapidamente em ortofosfatos nas águas naturais.

O crescimento acelerado e desordenado das criações intensivas de suínos, muitas vezes torna difícil o seu planejamento e o tratamento dos seus efluentes. Assim, com os elevados volumes de dejetos produzidos nas instalações suinícolas, tanto os médios quanto os grandes produtores têm excedente de resíduos que precisam ser tratados eficientemente para eliminar ou, pelo menos, minimizarem os problemas de degradação ambiental gerados por esta atividade. Entretanto, a qualidade do efluente tratado não passa por monitoramento periódico, apresentando, em sua maioria, apenas a eficiente remoção de carga orgânica, existindo poucas preocupações com relação à remoção dos nutrientes, dos metais pesados e dos microorganismos patogênicos presentes nos dejetos suínos (BORTOLI, 2010).

A problemática descrita é resultado da falta de um programa de sustentabilidade da suinocultura no Brasil, que integre os produtores de suínos e as agroindústrias. A resolução desses problemas passa pelo estabelecimento de estratégias que integrem os componentes: humano (formação de recursos humanos), técnico (desenvolvimento de metodologias e tecnologias) e de sensibilização (educação ambiental) (BELLI FILHO et al., 2001), visando a redução dos impactos da atividade e o reaproveitamento integral desses resíduos (SOUZA, 2009).

3.4.2. Legislação Ambiental

A edição das leis de crimes ambientais e de gerenciamento de recursos hídricos, bem como a pressão dos órgãos sanitários no sentido do licenciamento ambiental deste tipo de atividade agropecuária, está possibilitando a aplicação de tecnologias que agreguem valor aos dejetos e, ou, que minimizem os danos ambientais causados (DETTMER, 2003).

A resolução da CONAMA 357/05, através do Art. 1º, dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, estabelecendo as condições e padrões de lançamento dos efluentes. No seu capítulo I, artigo VII – refere-se à carga poluidora: diz que a quantidade de determinado poluente transportado ou lançado em um corpo de água receptor, expressa em unidade de massa por tempo.

Os valores máximos admissíveis dos parâmetros relativos às formas químicas de nitrogênio e fósforo, nas condições de vazão de referência, poderão ser alterados em decorrência de condições naturais, ou quando estudos ambientais específicos, que considerem também a poluição difusa, comprovem que esses novos limites não acarretarão prejuízos para os usos previstos no enquadramento do corpo de água. Para águas doces de classes 1 e 2, quando o nitrogênio for fator limitante para eutrofização, nas condições estabelecidas pelo órgão ambiental competente, o valor de nitrogênio total (após oxidação) não deverá ultrapassar 1,27 mg/L para ambientes lênticos e 2,18 mg/L para ambientes lóticos, na vazão de referência. Já para efluentes, é permitido na saída 20 mg/L de N.

Atender a um padrão de emissão igual a 5 mg/L para a amônia pode ser difícil para muitos sistemas, já que este composto é bastante tóxico e restritivo à vida dos peixes, sendo que muitas espécies não suportam concentrações acima de 5 mgL⁻¹. Além disso, como visto anteriormente, a amônia provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais ao ser oxidada biologicamente, a chamada DBO de segundo estágio. Por estes motivos, a concentração de nitrogênio amoniacal é importante parâmetro de classificação das águas naturais e normalmente utilizado na constituição de índices de qualidade das águas.

Já os nitratos apresentam toxicidade e são capazes de causar a doença metahemoglobinemia infantil, na qual o nitrato é reduzido a nitrito na corrente sanguínea e compete diretamente pelo oxigênio livre

na corrente sanguínea e assim o sangue fica azul, podendo ser letal para crianças (LINCOLIN; EARLE, 1990). Por essa razão, o nitrato é padrão de potabilidade, sendo 10 mgL^{-1} o valor máximo permitido pela Portaria 36. Além disso, os nitritos próprios são importantes como precursores de compostos N-nitroso, principalmente nitrosaminas, que têm recebido considerável atenção devido as suas possíveis propriedades carcinogênica, teratogênica e mutagênica (ABEL, 1989).

Segundo a Resolução CONAMA 357/2005, considera-se a manípueira enquadrada na classe 2, que determina como limite máximo de DBO o valor de 5 mg.L^{-1} (CONAMA, 2005). Este valor poderá ser ultrapassado no caso de efluente de sistemas de tratamento de águas residuárias que reduza a carga poluidora em termos de DBO em 5 dias, o teste deve ser realizado à temperatura de 20°C do despejo em no mínimo 80%. Caso pretenda-se lançar o efluente em corpo receptor, o sistema deve ser planejado de forma que se atenda a Legislação Ambiental, cuja exigência é de que o efluente atinja o padrão de lançamento (DBO de 60 mg.L^{-1}) ou que o sistema tenha eficiência de 85% na remoção de DBO e que o lançamento do efluente tratado não venha a alterar a classe de enquadramento dos cursos d'água (BORGUETTE, 2009).

3.5. Tratamento de efluentes com microalgas

A crescente evolução tecnológica e o desenvolvimento das atividades humanas e agropecuárias nos últimos tempos vêm gerando cada vez mais elevados volumes de efluentes urbanos e industriais. Desta forma, conforme mencionado no item anterior, os mesmos não podem ser lançados no ambiente sem o devido tratamento, para promover a redução dos compostos presentes, tornando-os seguros à saúde e ao ambiente (ASLAN; KAPDAN, 2006; XIN et al., 2010).

O tratamento de efluentes envolve altos custos, desta forma, há interesse na pesquisa e em estudos de novos processos para a remoção de nutrientes e matéria orgânica. O projeto de planta idealizada pela maioria seria uma combinação para tratar o efluente e ao mesmo tempo obter produtos de interesse biotecnológico e que permita agregar valor ao final do processo (QUEIROZ et al., 2001; MANETTI, 2008; QUEIROZ et al., 2011; BONINI, 2012).

A pesquisa sobre a utilização de microalgas como um processo de tratamento terciário de águas residuais foi iniciada em meados dos anos 50, porém foi na década de 1970 que os projetos foram difundidos. O efluente servia como meio e fonte de nutrientes, principalmente

nitrogênio e fósforo, assim as microalgas poderiam converter a energia solar em biomassa útil e incorporando os nutrientes (DE LA NOÛE; DE PAUW, 1988) favorecendo tanto ao ambiente, quanto á energia (LOURENÇO, 2006). Essa idéia foi disseminada nos Estados Unidos por Oswald e Gotaas (1957) e foi intensivamente testado em muitos países (GOLDMAN, 1979; SHELEF; SOEDER, 1980; DE PAUW; VAN VAERENBERGH, 1983).

De maneira geral, o tratamento de efluentes é uma medida importante para reduzir os contaminantes e outros poluentes presentes nas águas residuais. Tendo início a partir do processo de tratamento primário, onde os sólidos, óleos e gorduras são removidos. Já o tratamento secundário elimina produtos químicos presentes no efluente e ao final é realizado o tratamento terciário, o que remove os micróbios de águas residuais antes de serem descartados nos rios (RAWAT et al., 2011; SRIRAM; SEENIVASAN; 2012).

Estudos já foram realizados, como o de Tam e Wong (1989) e de Gonzáles et al. (2008) para identificar o uso potencial das microalgas em sistemas de tratamento secundário e também em um pré-tratamento. Entretanto, os sistemas de algas têm sido tradicionalmente e amplamente empregados em processos terciários (LAVOIE; DE LA NOÛE, 1985; MARTIN et al, 1985;. OSWALD, 1988).

O processo de tratamento terciário remove carbonatos, amônio, nitrato e fosfato, variando de acordo com a planta. Pode ser realizado quimicamente ou biologicamente, com a tecnologia e a compreensão dos sistemas, o processo biológico de tratamento terciário demonstrou um bom desempenho quando comparado com os tratamentos químicos que são utilizados normalmente, e que geralmente apresentam um alto custo e podem conduzir a poluição secundária (ABDEL-RAOUF et al., 2012). No entanto, cada etapa adicional em uma planta de tratamento de efluente aumenta muito o custo total, assim o custo relativo de tratamento dobra para cada passo adicional (OSWALD, 1988).

Quando comparado com o tratamento convencional de águas residuais, em que um floco biológico degrada a matéria orgânica carbonácea até CO_2 , às algas podem assimilar poluentes orgânicos em componentes celulares como lipídios e carboidratos, alcançando assim redução de poluentes sem gerar danos ao ambiente (WANG et al, 2010). As algas podem ser utilizadas no tratamento de águas residuais para uma gama de fins, alguns dos quais são usados para a redução de bactérias presentes (incluindo coliformes), redução da DBO e da DQO, remoção de nutrientes como nitrogênio e fósforo (N e ou P), e também para a

remoção de metais pesados (ABDEL-RAOUF et al., 2012). De acordo com o interesse é escolhido à fase do tratamento em que será empregado o uso das microalgas.

Para ser obtido um crescimento eficaz das microalgas em águas residuais, muitas variáveis podem influenciar diretamente, assim como em qualquer meio de cultivo, as variáveis críticas são o pH, a temperatura, a concentração de nutrientes essenciais, incluindo o N, P e carbono orgânico (e as relações destes constituintes), e a disponibilidade de luz, O₂ e CO₂. Além destes já descritos para o cultivo, a presença de toxinas como cádmio e ou mercúrio, ou produtos químicos e orgânicos é outro fator que merece atenção para o crescimento em águas residuais. Essa situação é comum em efluentes industriais e seus derivados de águas residuárias, em que os fatores bióticos podem impactar negativamente o crescimento de algas, como a presença de bactérias patogênicas ou predatórias no zooplâncton, além de outros microorganismos nas águas residuais que podem competir diretamente com as mesmas por nutrientes essenciais (PITTMAN et al., 2011).

De acordo com o trabalho de PITTMAN et al. (2011), as microalgas podem crescer em diferentes efluentes sob situações diversas, como: águas residuais de estações de tratamentos de efluentes domésticos, águas residuais efluentes agropecuários, os mais variados efluentes industriais e meios sintéticos simulando alguns efluentes reais. Embora a aplicação de microalgas no efluente indústria ainda seja bastante limitada, as algas são utilizadas em todo o mundo para tratamento de águas residuais, porém, em uma escala relativamente pequena (WANG et al., 2010).

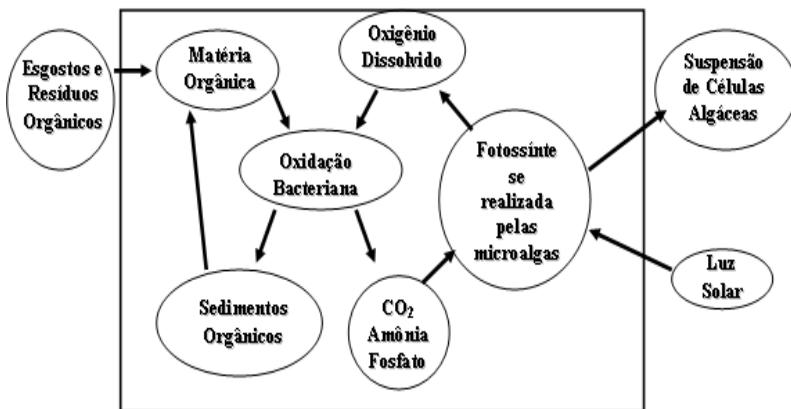
Os atributos ideais de espécies de algas para utilização no tratamento de águas residuais, principalmente em lagoas de estabilização de alta taxa são: (1) elevada produtividade de crescimento (alta produtividade) quando alimentados com nutrientes de águas residuais que são predominantemente N-amoniacal e P-fosfato, (2) tolerância a variação sazonal e diurna em condições de crescimento ao ar livre, (3) formação de agregados permitindo assim a separação pela gravidade simples (PARK et al., 2011).

Muitas espécies de microalgas são capazes de crescer em águas residuais. Palmer (1974) pesquisou gêneros de microalgas a partir de uma ampla distribuição de lagoas de estabilização, obtendo como resultados uma abundância de microalgas de acordo com a sua frequência, assim *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Oscillatoria*, *Micractinium* e *Golenkinia* foram as mais encontradas (ABDEL-RAOUF et al., 2012). Porém, variadas espécies de microalgas são

utilizadas para o tratamento de efluentes, quer seja isoladamente ou em sistemas integrados com bactérias- microalgas, entre elas *Oscillatoria*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Cymbella*, *Euglena*, *Ankistrodesmus*, *Anabaena* e *Micractinium*, já foram bem elucidadas (LOURENÇO, 2006).

A dinâmica de um sistema integrado de tratamento com bactérias- microalgas estendem-se além da produção de O_2 pelas microalgas e que serão usadas pelas bactérias para a oxidação dos resíduos, envolvem tanques para depósito da fermentação do metano e de sólidos suspensos, oxidação da matéria orgânica dissolvida, remoção de amônio, nitrato e fosfato, precipitação de cálcio e magnésio e outros metais, bem como a desinfecção da biomassa formada ao fim do processo (LOURENÇO, 2006), como segue a Figura 10.

Figura 10- Representação esquemática da dinâmica envolvida no tratamento de efluentes domésticos por meio de um sistema integrado bactérias- microalgas, onde deve haver movimentação constante no processo.



Fonte: Modificado de OSWALD (1988).

Desta forma, utilizando-se as microalgas de forma isolada ou em sistemas integrados, para redução de matéria orgânica ou até mesmo para a remoção de nutrientes e desinfecção deve-se avaliar qual a melhor alternativa para cada sistema e planta qual a viabilidade real. Para tanto é preciso um conhecimento prévio sobre principalmente à caracterização do efluente ao qual será submetido ao tratamento, a partir deste critério faz-se a escolha do organismo que melhor desempenhará esta tarefa e que ao fim gere biomassa.

3.5.1. Remoção de Nutrientes (Nitrogênio e Fósforo)

O uso de microalgas tem sido proposto como visto anteriormente a bastante tempo, nesse contexto muitos estudos já foram realizados e comprovaram a eficiência de remoção de nutrientes inorgânicos que podem ser incorporados à biomassa cultivada e assim gerar um subproduto útil e de interesse (XIN et al., 2010; BONINI, 2012). As microalgas possuem papel importante na reciclagem de nutrientes e por essa razão autores como Aslan e Kapdan (2006) referem-se ao uso de microalgas com vantagens para a remoção de fósforo e nitrogênio, pois apresentam um baixo custo de operação, há um ganho em biomassa e assim evita-se o descarte de lodo em corpos receptores de água.

A remoção de nutrientes está se tornando uma importante prioridade para plantas de tratamento de esgotos, devido ao impacto deletério destes produtos químicos têm sobre os corpos receptores de tratamento de águas residuais planta de efluentes (SINGH; THOMAS, 2012).

Como mencionado anteriormente, a principal forma de remoção destes nutrientes é por absorção celular e o amoníaco pode ser extraído pelo aumento do pH. Entretanto estes só poderão ser consumidos se a água residuária apresentar uma relação adequada entre N/P (XIN et al., 2010), porém para a realização deste processo não há necessidade da presença de carbono para que ocorra a remoção de nitrogênio e fósforo, neste sentido seu uso é atraente para o tratamento de efluentes secundários (ABDEL-RAOUF et al., 2012).

As mais utilizadas culturas de microalgas para remoção de nutrientes são espécies de *Chlorella* (LEE; LEE, 2001; KUMAR et al., 2010), *Scenedesmus* (GONZÁLEZ et al., 19997; MARTÍNEZ et al., 2000; KIM et al., 2007) e *Spirulina* (OLGUÍN et al., 2003; MEZZOMO et al., 2010).

Visando compreender o processo e aperfeiçoar a remoção de nitrogênio e fósforo, muitos estudos concentraram-se em fatores ambientais que podem vir a influenciar crescimento de microalgas, como a concentração de nutrientes (ASLAN; KAPDAN, 2006), a forma de nutrientes (HYENSTRAND et al., 2000), disponibilidade de luz (LEE; LEE., 2001). Os efluentes de maneira geral podem conter diferentes formas de nitrogênio inorgânico (nitrato, amônio, nitrito), desta forma, é importante saber o efeito de desses diferentes compostos no crescimento das microalgas e também a remoção de nutrientes. Alguns projetos de pesquisa (HYENSTRAND et al., 2000) relataram que o amônio era mais fácil de ser absorvido por algas que o nitrato, devido

à falta da enzima nitrato redutase em células de algas. No entanto, a influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre o processo de cultivo de algas e nutrientes tem sido pouco relatada (XIN et al., 2010)

3.5.2. Efluentes Agropecuários

O meio de cultivo para o crescimento e desenvolvimento de microalgas deve possuir alguns nutrientes essenciais, como referenciados anteriormente, dentre os quais o carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (WANG et al., 2008). Neste sentido as águas residuárias vêm sendo usadas para cultivar estes organismos já que apresentam elevadas concentrações destes nutrientes (BONINI, 2012).

Assim é sabido que o cultivo de microalgas em efluentes agropecuários já foi estabelecido, sendo utilizado para uma ampla variedade de efluentes, como: a vinhaça, que é um subproduto obtido a partir da cana-de-açúcar (BONINI, 2012), manipueira que é um resíduo da cultura de mandioca (BORGUETE, 2009), efluente da indústria de arroz parbolizado (JACOB-LOPES, 2007), efluentes provenientes da biodigestão de aves e suínos (VENDRÚSCULO, 2009) e finalmente os mais diversos efluentes provenientes da suinocultura (CHENG et al., 2002; OBAJA et al., 2003; RODRIGUEZ; BELLI FILHO, 2004; KIM et al., 2007; KUMAR et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2011).

3.5.3. Efluentes da Suinocultura

Muitos estudos têm mostrado que o dejetos provenientes da suinocultura apresenta elevado teor de nutrientes, ou os seus subprodutos, como o efluente da digestão anaeróbia (FENTON; Ó HUALLACHÁIN, 2012). Grande quantidade de resíduos produzidos na indústria pecuária poderia ser reutilizada para produzir produtos de valor tais como microalgas, que são utilizados predominantemente no tratamento primário das águas residuais para a biorremediação.

A eficiência para a remoção de amônia e fósforo foi comprovada no trabalho realizado por González et al. (1997). Neste foi realizado o tratamento do efluente agroindustrial secundário de uma indústria de laticínios e suinocultura, em que foi avaliado o crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus* sob diferentes biorreatores (um triangular e outro cilíndrico). No entanto, a eficiência final para ambas as microalgas ao fim de cada ciclo foi semelhante.

Usando *C. vulgaris*, o biorreator triangular apresentou remoção superior para a amônia, enquanto o cilíndrico foi superior para a remoção de fósforo.

Em 2000, Rodriguez trabalhou com a microalga *Chlorella minutíssima* para realizar quatro experimentos com dejetos suínos visando estabelecer a diluição ideal de trabalho, aumentar a escala sob condições semi-controladas, adição de uréia para o controle do pH do meio e por fim testou-se a quitozana como agente floculante. Assim obteve-se crescimento positivo no dejetos para a concentração igual a 280 mgL^{-1} de DQO para uma profundidade de 20 cm, reduziu-se a DQO, turbidez, concentração de sólidos totais, voláteis, suspensos, amônia, orto fosfato e fosfato total. A concentração de floculação com a quitozana foi de 12 mgL^{-1} por 20 minutos de exposição.

No trabalho realizado por Bertolin et al. (2004), estudou-se o cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* utilizando-se efluente sintético de suíno para avaliar o crescimento de duas cepas dessa cianobactéria, em função da diluição do meio e da concentração de bicarbonato de sódio. Neste sentido conclui-se que existe diferença para as cepas avaliadas e que o crescimento é favorecido pela diluição do meio de cultivo, sendo que para cada variável avaliada houve uma diferença cepa, porém ambas podem ser cultivadas em efluente sintético suíno.

Já no trabalho de Fioresi e Sipaúba-Tavares (2008) investigou-se a influência do meio à base de esterco suíno *in natura* e biodigerido, sobre o crescimento e desenvolvimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis*. Foi percebido que o requerimento de luz foi diferente entre os meios, com menor intensidade para o esterco biodigerido ($13,5 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), indicando menor custo benefício. O meio a base de esterco suíno, mostrou bons resultados para o crescimento de *A. gracilis*, com qualidade de água adequada para cultivo, podendo ser utilizado para cultura em larga escala.

No estudo sobre o efeito da concentração inicial de microalgas em águas residuais do tratamento de suínos realizado por Travieso et al. (2006) foi desenvolvida uma cultura mista de bactérias e *Chlorella vulgaris*. A remoção de DQO e as concentrações de microorganismos aumentaram com o passar do tempo, no entanto, houve inibição do crescimento quando a concentração inicial do substrato aumentou para DQO 1100 mg/L , assim houve diminuição da remoção de DQO e da concentração de microorganismos, foi observada uma forte relação entre a razão da

concentração inicial do substrato e da concentração inicial de microorganismos, com a taxa de crescimento específico.

Neste estudo foi utilizado o efluente digerido de suínos como fonte de nutrientes para substituir o meio sintético de cultivo o crescimento de *Chlorella vulgaris*. Dois experimentos foram realizados para investigar o efeito das concentrações de nitrogênio amoniacal total, meios de inóculo e as frequências de alimentação sobre o desempenho das microalgas. Assim foi possível inferir que uma produção com alta densidade de *C. vulgaris* poderia ser conseguida a curto período de tempo pela alimentação de efluente digerido (KUMAR et al., 2010).

No trabalho descrito por An et al. (2003) foi desenvolvido um estudo laboratorial para a remoção de nitrogênio e fósforo em águas residuais provenientes da suinocultura após pré-tratamento por biorreator de membrana (MBR), com fermentação acidogênica como fonte de crescimento para a microalga verde *Botryococcus braunii* UTEX 572, juntamente com as medições de formação de hidrocarbonetos pela alga. Neste contexto foi verificado que *B. braunii* cresceu bem em águas residuais suínas, com peso celular seco igual a $8,5 \text{ mgL}^{-1}$ e uma produção de hidrocarbonetos de $0,95 \text{ gL}^{-1}$ foram obtidas, sendo que 620 mgL^{-1} de nitrato foram removidas do meio.

Águas residuais de suínos foram usadas para o cultivo mixotrófico da microalga *Chlorella pyrenoidosa* após um tratamento primário, em que simplesmente o efluente foi diluído antes do uso para a produção de biomassa e de ácidos graxos. Obtendo-se uma eficiência de remoção de amônio superior a 90% em todas as amostras diluídas e foi verificado que os perfis de ácidos graxos encontrados nos lipídios eram diferentes após cultivo com o efluente quando comparado com o meio de cultivo sintético Bristol. Assim conclui-se que este tratamento foi eficaz para reduzir o elevado teor de matéria orgânica dos resíduos suínos com uma produção de lipídeos provenientes de microalgas (WANG et al., 2012).

Shen et al (2012) tiveram por objetivo fixar a concentração de nitrogênio total (NT) e fósforo total (PT) em efluente suíno para a produção de biomassa, avaliando o crescimento individual das espécies de microalgas *Scenedesmus obliquus* e da *Chlorella* sp., bem como o crescimento misto. A concentração de efluente variou de 25 a 100%, os resultados indicaram que a concentração do meio e o pH são fundamentais para a geração de biomassa e por conseguinte remoção de N total e P total, no cultivo misto com as espécies testadas a concentração de trabalho foi 75% do efluente com 10 dia de cultivo onde foram removidos 87,3% de NT e 64,3% de PT.

Assim, com o intuito de complementar os estudos referenciados, e de acordo com as características do efluente foram encontradas informações importantes que poderão contribuir para o tratamento dos dejetos, diminuindo assim os impactos causados por esta produção. Desta forma, visando colaborar para um melhor entendimento sobre o comportamento das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Haematococcus pluvialis* em efluente proveniente da suinocultura e sob as condições de cultivo á elas impostas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos do Laboratório de Tratamento Biológico de Resíduos (LTBR), o qual está locado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1. Obtenção e aclimação das cepas

Dois organismos teste deste trabalho, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus quadricauda* foram escolhidos por apresentarem um fácil cultivo e manipulação. São amplamente difundidos e pesquisados na área de tratamento biológico de efluentes. Estudos já foram realizados partindo do isolamento destas espécies de estações de tratamento de efluente doméstico, ambientes eutróficos e também em águas residuais de diferentes setores industriais, tendo como interesse a remoção dos nutrientes fósforo e nitrogênio (GONZÁLEZ et al., 1997; MARTÍNEZ et al., 2000; FIERRO et al., 2008; MARIN et al., 2010). A microalga *Haematococcus pluvialis* foi escolhida, pois apresentou um bom crescimento de biomassa perante efluentes domésticos e suínos, promovendo a remoção de nutrientes no trabalho de Kang et al (2006). Esta microalga é produtora do carotenóide astaxantina e por essa razão, pode agregar valor ao tratamento realizado.

As microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Haematococcus pluvialis* foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e apresentam o seguinte histórico: *C. vulgaris* foi isolada na região de São Carlos, SP; *S. quadricauda* e *H. pluvialis* foram provenientes do banco de cultura de algas da University of British Columbia (Canadian Center for the Culture of Microorganisms).

Logo que chegaram ao LTBR as mesmas foram inoculadas no meio Water Culture (WC), adaptado de Guillard e Lorenzen (1972), em que a composição está descrita na Tabela 2, para aclimação e crescimento. A esterilização do meio de cultura foi realizada em autoclave a 121°C por 15 minutos conforme, APHA (2005). O primeiro inóculo foi realizado em tubos de ensaio no volume de 10 ml e posteriormente foram transferidos para frascos erlenmayer de 125 ml, 250 ml e por último 500 ml. A concentração de inóculo correspondia sempre a 10% do volume final da cultura. Os frascos foram mantidos

em incubadora DBO com iluminação constante (fotoperíodo de 24h) (ZHANG et al., 2011), promovida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” da marca Taschibra com 20 watts de potência cada, o que corresponde a uma intensidade luminosa igual a $56 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (JACOB LOPEZ, 2007), medidos pelo equipamento Luxímetro da marca Minipa modelo MLM 1010 (precisão de $\pm 4\%$), temperatura controlada por sensor, com *set point* para $25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (GROSMAN et al., 1994), o pH no meio entre 6 e 8 (RODRIGUES, 2000) e tempo de incubação de 10 a 13 dias (AN et al., 2003). Frente á essas condições os micro-organismos foram submetidos experimentos.

Tabela 2- Composição da solução estoque de micronutrientes e vitaminas do meio Water Culture – WC.

Componente	Composição (g.L⁻¹)
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ . H ₂ O	0,01
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,01
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,18
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,006
H ₃ BO ₃	1
Na ₂ EDTA	4,36
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	3,2
Tamina	0,1
Biotina	0,0005

Fonte: Adaptado de GUILLARD; LORENZEN (1972).

Tabela 3- Composição dos macronutrientes do meio de cultura WC.

Componente	Composição (g.L⁻¹)
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,0367
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,0399
NaHCO ₃	0,0125
K ₂ HPO ₄	0,0088

NaNO ₃	0,085
Na ₂ SiO ₃ . 5H ₂ O	0,032

Fonte: Adaptado de Guillard; Lorenzen (1972)

O Meio WC era composto pela solução descrita na Tabela 3 com a adição de 1 mL.L⁻¹ da solução apresentada na Tabela 2.

4.2 TESTES DE TOXICIDADE

Este experimento foi realizado com o intuito de identificar se haveria algum efeito tóxico da concentração de nitrogênio presente no efluente suínico e verificar qual seria a melhor diluição para a realização do cultivo. O meio de cultivo sintético suíno utilizado foi descrito por Bertolin et al. (2005), conforme a Tabela 4. A concentração deste meio foi de 113,5 mg.L⁻¹ de PO₄³⁻ e 224,7 mg.L⁻¹ de NH₄⁺ e a partir desta solução foram realizadas diluições de 100, 80, 50 e 20% do meio em água destilada estéril. Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 20 ml, com mistura manual diária e incubada nas mesmas condições da aclimação das cepas descritas no item 4.1. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como uma média aritmética dos mesmos.

Tabela 4. Composição do efluente sintético suíno.

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	0,60000
K ₂ HPO ₄	0,72000
NaNO ₃	0,00100
KCl	0,40000
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,40000
CaCl	0,05000
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,04000
H ₃ BO ₃	0,00500
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,00300

ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,01350
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,00500
MoO ₃	0,00003
CoCl ₂	0,00010
NH ₄ Cl	0,96120
EDTA	0,10000
Na ₂ SO ₄	0,60000

Fonte: Adaptado de Bertolin et al. (2005).

4.2.1. Avaliações do Crescimento em Meio Suíno Sintético:

Os ensaios foram realizados em cultivo tipo batelada, em frascos erlenmayer de 250 ml, contendo 120 ml de meio de cultura, onde foi acrescentado 12 ml de inóculo, valor que corresponde a 10% do volume final da cultura. O cultivo foi realizado com iluminação constante, ou seja, fotoperíodo correspondendo à 24h de luz e incubados em câmara de DBO com temperatura controlada em 25°C ± 0,5°C. Diariamente eram retiradas amostras assepticamente em câmara de fluxo laminar, conforme descrito por APHA (2005), e determinados: a concentração celular e clorofila *a*; o pH através do pHmetro da marca Luton; e as concentrações de NH₄⁺ e de PO₄⁻, os quais foram determinados pelos métodos colorimétricos de Nessler (VOGEL, 2002) e Vanadomolibdofosfórico, descrito por APHA (2005), respectivamente, melhor descritos no item 4.3.4. Todos os ensaios desta série foram feitos em triplicata e os seus resultados expressos como média aritmética dos mesmos.

4.3. Obtenção do efluente suíno

O efluente suíno foi obtido a partir da Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS) da Embrapa Aves e Suínos, localizada em Concórdia, Santa Catarina. O efluente foi trazido em frascos plásticos de 5 litros e mantido refrigerado até o momento do processamento em laboratório. A Figura 11 apresenta uma fotografia da ETDS da EMBRAPA e a Figura 12 apresenta o fluxograma de processo da mesma.

Figura 11- Imagem da estação de tratamento de dejetos suínos da Embrapa Aves e Suínos, Concórdia, SC.



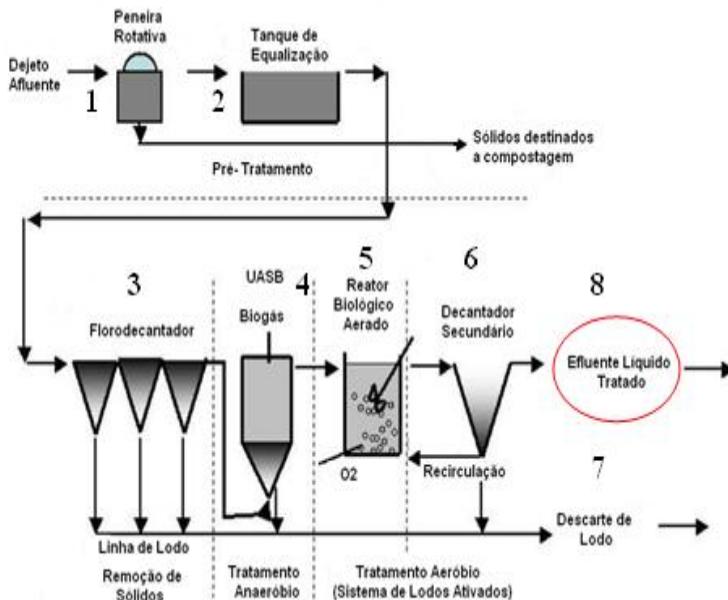
Fonte: PEREIRA et al. (2010).

Nesta estação de tratamento, o dejetos oriundo das granjas de criação de suínos é recebido e armazenado em um tanque com volume correspondendo a aproximadamente 6 m^3 . A seguir, o mesmo passa por uma peneira de escovas rotativas (1), que realiza a separação de sólidos grosseiros, maiores que 2 mm , posteriormente, o dejetos segue por gravidade até o tanque de equalização (2), onde ocorre a homogeneização do material residual. Após a passagem pelo tanque de equalização, o dejetos é bombeado para o Flotodecantador (3) onde ocorre um tratamento físico-químico, realizado pela adição de agentes flocculantes, como o tanino e a poliacrilamida. O sobrenadante desta etapa conduzido por gravidade até o reator biológico anaeróbico com manta de lodo de fluxo ascendente – Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) (4), onde os sólidos orgânicos suspensos são quebrados, biodegradados e digeridos através de uma transformação anaeróbica, resultando na produção de biogás e no crescimento da biomassa bacteriana. Os gases gerados no processo são armazenados e queimados na Câmara de Biogás.

O efluente do reator UASB alimenta o Reator Biológico Aeróbico (RBA) (5) cuja capacidade é de 80 m^3 e seu funcionamento é baseado no processo de lodos ativados, tendo por finalidade degradar biologicamente a matéria orgânica remanescente sob condições aeróbicas e promover a oxidação do nitrogênio amoniacal. Após a passagem pelo RBA, o efluente se desloca para o Decantador Secundário (DS) (6) onde sobrevém a separação do sólido-líquido, sendo que ao fundo o lodo é

depositado (7) e a fração líquida tratada (8) segue para o corpo receptor (PEREIRA et al., 2010).

Figura 12- Fluxograma da Estação de Tratamento de dejetos suínos da Embrapa Aves e Suínos, Concórdia, SC, com numeração indicativa a partir da descrição do processo e ênfase para o efluente utilizado no presente trabalho.



Fonte: KUNZ et al. (2009).

Tabela 5- Resultados médios (mg.L^{-1}) das análises realizadas no acompanhamento da EDTS - EMBRAPA, Concórdia, SC nos anos de 2005 e 2006.

Parâmetro	Efluente (mg.L^{-1})	Afluente (mg.L^{-1})	Remoção (%)
DBO	9.150	250	97
DQO	17.570	550	97
NTK	1.840	440	85
PT	490	70	86

Fonte: KUNZ et al. (2009).

O efluente empregado para a realização dos experimentos é proveniente da saída do RBA (lodos ativados), ou seja, o efluente final da estação de tratamento que será descartado em corpos receptores d'água e que está identificado na Figura 12 pelo número 8. Para tanto, busca-se realizar um polimento final que permita o lançamento do efluente conforme a resolução 357 do CONAMA, embora o sistema demonstre eficiência na remoção de nutrientes e matéria orgânica, conforme demonstrado na Tabela 5.

Para caracterizá-lo, foram realizadas determinações analíticas da série de sólidos (ST, SV, SF, SST, SSV e SSF), alcalinidade, demanda química de oxigênio (DQO), pH, além dos íons amônio, nitrato, nitrito e fosfato.

4.3.1. Teste de Crescimento em Diferentes Fontes de Nitrogênio

Para tal foi utilizado o meio de crescimento descrito na Tabela 1, em que a fonte de nitrogênio foi substituída por sais de NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- , nas mesmas concentrações de nitrogênio. O teste foi realizado em tubos de ensaio de 20 ml contendo 10 ml de meio autoclavado por 15 minutos a 120°C e 1 atm de pressão, em seguida foi adicionado 1 ml de inóculo, em triplicata para cada microalga e cada fonte de nitrogênio, teve duração de 10 dias e a cada 24 h eram realizados a homogeneização do meio e o rodízio dos tubos, para que todos recebessem a mesma intensidade luminosa. Ao final do experimento foi verificado o crescimento qualitativo de cada microalga avaliada.

4.3.2. Avaliação do Crescimento em Efluente Suíno Real

O ensaio foi realizado a partir do cultivo batelada, em frascos erlenmayer de 500 ml com o volume de 300 ml de efluente autoclavado, com inóculo correspondendo a 10% do volume final do meio. Assim como os outros experimentos, foi feita triplicata para cada microalga avaliada, sob as condições de iluminação constante, ou seja, fotoperíodo correspondendo a 24 h de luz, com incidência luminosa igual a $56 \mu\text{mol}$ de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e temperatura aproximada de 25°C controlada por sensor da incubadora DBO e confirmado através da medição por termômetro de mercúrio. A Figura 13 apresenta uma fotografia dos frascos incubados na câmara de DBO.

Diariamente eram retirados 10 ml de amostra de cada unidade experimental, assepticamente em câmara de fluxo laminar, sendo que as mesmas eram armazenadas em tubos de ensaio de 12 ml previamente autoclavados. A partir destas amostras eram realizadas as análises de biomassa, clorofila *a* e carotenóides, bem como o acompanhamento de NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- e de PO_4^{3-} , os quais foram realizados por métodos colorimétricos, além do pH, monitorado pelo pHmetro da marca Luton. Os métodos empregados estão descritos no item 4.3.4 a seguir. Quando necessário, o pH do meio foi ajustado com a adição de ácido sulfúrico 0,05N.

Figura 13- Imagem dos frascos na câmara de DBO para o experimento com efluente real suíno.



4.3.3. Determinações Analíticas Rotineiras

As determinações analíticas foram realizadas diariamente ao longo dos experimentos.

4.3.3.1. Determinação de Nitrito

O composto nitrito (NO_2^-) foi determinado através do kit analítico NitrVer2 da empresa Hach Company. O método 8153, descrito no manual de análises e procedimentos da companhia, emprega o sulfato ferroso em meio ácido para reduzir o nitrito para óxido nítrico.

Os íons ferrosos combinam com o óxido nítrico para formar um complexo marrom-esverdeado em proporção direta com o nitrito presente. O óxido então é convertido em um cromógeno através da reação com cádmio, permitindo a leitura em espectrofotômetro (Adaptado de McALPINE, 1933).

4.3.3.2. Determinação de Nitrato

Esta análise foi realizada seguindo o método do ácido salicílico descrito por Catoldo et al. (1975). A análise é descrita como uma rápida determinação para NO_3 , em que o método baseia-se na formação de um complexo formado pela nitritação do ácido salicílico em condições ácidas, em que a absorvância é realizada sob condições básicas, com pH superior a 12. Assim, para realizá-la é colocado 0,2 ml de amostra em um tubo de ensaio com capacidade superior a 25 ml e adiciona-se 0,8 ml de solução $\text{AS-H}_2\text{SO}_4$. Aguarda-se 20 minutos para que a reação ocorra e em seguida é acrescentado 19 ml da solução de NaOH com concentração de 2N, espera-se esfriar a solução e posteriormente é realizada a leitura em espectrofotômetro HACH DR 2010 em 410 nm. A curva padrão foi preparada com NaNO_3 , abrangendo a faixa de 0-70 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ e sua coloração amarela é proporcional á quantidade de nitrato encontrado na amostra.

4.3.3.3. Determinação de Amônio

Para a realização da análise, foi usado o método proposto por J. Nessler e descrito em Vogel (2002). A análise é realizada pela determinação do íon amônio (NH_4^+), identificado através da adição de solução alcalina de iodeto de mercúrio II em uma solução de iodeto de potássio como reagente que possibilita a determinação colorimétrica de amônia. Quando o reagente Nessler é adicionado a uma solução diluída que contenha sais de amônio, a amônia liberada reage rapidamente, porém não instantaneamente, formando um produto de coloração laranja- marrom que permanece em solução de forma coloidal e floclula com o tempo.

4.3.3.4. Determinação de Fosfato

O método realizado para esta análise é intitulado vanadomolibdofosfórico (APHA, 2005; VOGEL, 2002). Neste, a determinação de fósforo é realizada em duas etapas: na primeira ocorre

a transformação do fósforo em ortofosfato e na segunda a reação de calorimetria. A análise é fundamentada na diluição de um ortofosfato, onde a adição de molibdato de amônia em condições ácidas forma um heteroácido, provocando a formação do molibdofosfórico, que resulta em uma coloração amarelada, cuja intensidade do amarelo é proporcional a concentração de fosfato, sendo o limite de detecção da análise de $2-10 \text{ mg de P-PO}_4^{3-}\text{L}^{-1}$.

4.3.3.5. Análise de Clorofila *a*

A determinação de clorofila *a* foi desenvolvida segundo o método espectrofotométrico descrito em Lourenço (2006). Para tal foi realizada a extração do pigmento a partir de uma solução de acetona 90% v/v, assim as amostras retiradas diariamente eram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$. Após a filtração, os filtros eram colocados em tubos de ensaio de 10 ml com tampa onde se adicionava 5 ml da solução de acetona e com o auxílio de um bastão de vidro macerava-se o conteúdo e era acrescentado o volume final para completar os 10 ml. Estes tubos foram vedados com papel alumínio e mantidos 24h sob refrigeração a 4°C . Posteriormente a esse período foi realizada a centrifugação dos tubos em centrífuga Sigma em temperatura ambiente e rotação de 3000 rpm durante 10 min, compactando os resíduos do filtro no fundo do tubo. Ao fim deste processo as amostras eram submetidas à leitura espectrofotométrica.

A determinação espectrofotométrica da concentração de pigmentos fotossintéticos, nomeadamente da clorofila *a*, foi efetuada utilizando os comprimentos de onda estipulados por Lorenzen (1967). A leitura foi feita em dois comprimentos de onda submetidos a duas situações diferentes, a primeira leitura foi realizada em 664 nm e depois em 750 nm, ao final deste foi adicionado $100 \mu\text{l}$ de HCl a 0,25 M, os frascos foram agitados e após 1 min foi realizada novas leituras nos mesmos comprimentos de onda realizados anteriormente, o branco da análise é feito com a solução de acetona 90%. Todas as etapas do processo de extração para esta análise foram cuidadosamente realizadas ao abrigo de luz, ou seja, foram desenvolvidas na penumbra para que não houvesse a degradação da clorofila pela luz.

A partir das absorbâncias encontradas foi realizado o cálculo da concentração de clorofila *a* segundo Lorenzen (1967), conforme demonstrado na Equação (1):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg.m}^3\text{)} = \frac{A \times K \times (ABS_{665} - ABS_{665a}) \times v}{V \times c} \quad (1)$$

Em que:

A: coeficiente de absorção clorofila $a = 11$;

K: fator que equaciona a redução da absorbância na concentração inicial de

clorofila a após acidificação $= 2,43$;

v: volume de acetona utilizado para a extração (ml);

V: volume de amostra filtrada (L);

c: caminho óptico da cubeta (cm);

ABS₆₆₅: absorbância em 665nm;

ABS_{665a}: absorbância em 665 nm após a adição de ácido.

4.3.3.6. Análise de Carotenóides

Esta análise é realizada da mesma maneira que a análise de clorofila a , porém a concentração de carotenóides é calculada a partir da equação de Strickland e Parsons (1968), que estima o total de carotenóides presente na amostra, a partir dos extratos de acetona (LOURENÇO, 2006) a concentração é determinada através da Equação (2).

$$\text{Carotenóides totais (}\mu\text{g.L}^{-1}\text{)} = [7,6 \times ABS_{480\text{nm}} - (3,0 \times ABS_{750\text{nm}}) - 1,49 \times ABS_{510\text{nm}} - (2,0 \times ABS_{750\text{nm}})] \times \frac{v}{(V \times c)} \quad (2)$$

Onde:

v: volume acetona utilizado para a extração (L);

V: volume filtrado de amostra (L);

c: caminho óptico da cubeta (cm);

ABS: absorbância.

4.3.3.7. Determinação da Biomassa

Esta foi realizada através da densidade óptica no comprimento de onda igual a 560 nm, em espectrofotômetro HACH DR 2010. Neste comprimento de onda, a absorbância é atribuída à obstrução física da luz pelas células em suspensão (LOURENÇO, 2006). Contudo, após o fim do cultivo foi realizada a medida de massa seca a partir de amostras com 20 ml de cada unidade experimental, para então realizar uma correlação

de cada espécie de estudo entre a massa e a absorvância obtida diariamente. Para tal determinação, foi realizada a filtração a vácuo, com membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µm, previamente pesadas e depois colocadas em estufa de secagem por 24h a 105°C, posteriormente as mesmas foram colocadas em dessecadores até que esfriassem e foram novamente pesadas em balança analítica (GRIS et al., 2010). Através do cálculo de peso seco, a relação obtida entre a absorvância em 560 nm e a massa de microalgas de cada espécie é dada pelas Equações (3), (4) e (5).

$$\text{Biomassa } C. \text{ vulg aris } (g.L^{-1}) = 0,004 \times ABS_{560nm} \quad (3)$$

$$\text{Biomassa } S. \text{ quadricauda } (g.L^{-1}) = 0,001 \times ABS_{560nm} \quad (4)$$

$$\text{Biomassa } H. \text{ pluvialis } (g.L^{-1}) = 0,006 \times ABS_{560nm} \quad (5)$$

4.3.3.8. Determinação de sólidos suspensos totais e sólidos suspensos voláteis

Para a realização dos sólidos suspensos totais foi utilizada a metodologia desenvolvida por Olsson e Nielsen (1997) descrita por Zdradek et al. (2006). Inicialmente a membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,22µm foi seca em forno de microondas, na potência de 180 watts, durante 15 minutos e em seguida foi levada ao dessecador até esfriar e logo em seguida foi pesada em balança analítica. A mesma membrana foi utilizada para filtrar 10 ml do efluente aeróbio e retornou ao micro-ondas, conforme descrito anteriormente para retirar a umidade. A concentração de sólidos suspensos totais foi obtida pela diferença das massas secas antes e depois da filtragem da amostra, conforme a Equação (6).

$$SST = \frac{(m_f - m_i)}{V} \quad (6)$$

Onde:

SST: Concentração de sólidos suspensos totais (gSST/L);

m_i : massa do filtro após a secagem (g);

m_f : massa do filtro com a amostra após a secagem (g);

V: volume da amostra (L).

A concentração dos sólidos suspensos voláteis (SSV) foi realizada conforme *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, que promove a calcinação da biomassa em mufla a 550°C durante 15 minutos por cadinho (APHA, 2005).

4.3.3.9 Alcalinidade total

Para determinação de alcalinidade foi utilizado o método titulométrico (APHA, 2005). Este pode ser aplicado quando houver a presença de carbonato e bicarbonato. A reação é baseada na concentração dos íons OH^- , HCO_3^- e CO_3^{2-} que podem ser titulados por uma reação neutralizante até ser atingido o pH 4,5.

4.3.3.10. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A análise de DQO foi realizada segundo procedimento descrito pelo *Standard Methods for the examination of water and wastewater* (APHA, 2005). Por este método a matéria orgânica é oxidada pelo reagente dicromato de potássio em um meio ácido, que contém sulfato de prata como catalisador durante o processo de digestão, em refluxo fechado. Assim determina-se a quantidade de matéria orgânica a partir do oxigênio utilizado pelo processo de oxidação descrito.

4.3.4. Análise Estatística dos Dados

Para tal, foram utilizados os valores obtidos durante o acompanhamento dos experimentos descritos nos itens 4.2.1 e 4.3.3. Assim os dados foram submetidos a uma análise no software STATISTICA 7.0, onde foi realizado o teste Bartlett para determinar a homogeneidade e normalidade dos valores, quando necessário foi realizado um ajuste a partir da transformação dos mesmos para raiz, arco-seno ou log. A partir do resultado obtidos foram realizados os seguintes testes: se as amostras foram homogêneas e normais, foi feito o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey. Se o resultado do teste de homogeneidade e normalidade não foi positivo, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis e posteriormente o teste de Dunn. Todos os testes estatísticos foram verificados com uma significância de 95%.

4.3.5. Cálculos Realizados

4.3.5.1. Remoção de Nutrientes

Por se tratar de um cultivo em batelada, a remoção dos nutrientes de nitrogênio e fósforo foi realizada a partir do cálculo e transformada para porcentagem, segundo a Equação (7):

$$\eta = \frac{(C - C_0)}{C_0} \times 100 \quad (7)$$

Em que:

- η : remoção do nutriente em porcentagem (%)
- C: concentração inicial do nutriente
- C_0 : concentração final do nutriente

4.3.5.2. Produtividade

O cálculo da produtividade de cada microalga avaliada neste trabalho foi obtido através da Equação (8):

$$P = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta t} \quad (8)$$

Onde:

- P: produtividade em microalgas ($\text{mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$)
- X_0 : concentração celular inicial (mg.L^{-1})
- X: concentração celular final (mg.L^{-1})
- Δt : intervalo de tempo (d)

4.3.5.3. Velocidade de Crescimento (K)

A equação utilizada para calcular a velocidade de crescimento celular das microalgas do presente trabalho foi determinada por Stein (1973), conforme demonstrada na Equação 9:

$$K = \frac{3,322}{\Delta t} \times \log \frac{X_0}{X} \quad (9)$$

Em que:

- K: velocidade de crescimento (divisões. dia^{-1});
- 3, 322: fator de conversão do logaritmo de base 2 para a base 10;

Δt : intervalo de tempo (d);
 X: concentração inicial (mg.L^{-1});
 X₀: concentração final (mg.L^{-1});
 log: logaritmo base 10.

4.3.5.4. Consumo de Substrato (Fontes de Nitrogênio e Fósforo)

Para a verificação desta condição foi realizado o cálculo da velocidade de consumo de substrato para os nutrientes nitrogênio e fósforo avaliados neste trabalho, calculado a partir da Equação (10)

$$\mu_s = \frac{(S_0 - S)}{X} \Delta t \quad (10)$$

Onde:

μ_s : velocidade de consumo de substrato (d^{-1});
 S: concentração final de substrato (N ou P) (mg.L^{-1});
 S₀: concentração inicial de substrato (N ou P) (mg.L^{-1});
 X: concentração de biomassa (mg.L^{-1});
 Δt : intervalo de tempo (d).

4.3.5.5. Fator de Conversão de Nitrogênio e Fósforo em Células ($Y_{X/N}$ e $Y_{X/P}$)

Para identificar quanto de nitrogênio (11) ou fósforo (12) foi incorporado em biomassa, foi calculado o fator de conversão através dos valores obtidos pelo cálculo dos balanços de massa, conforme a fórmula abaixo:

$$Y_{X/N} = \frac{(X - X_0)}{(N_0 - N)} \quad (11)$$

$$Y_{X/P} = \frac{(X - X_0)}{(P_0 - P)} \quad (12)$$

Onde:

$Y_{X/N}$: fator de conversão de nitrogênio em célula (mg X. mg N^{-1});
 $Y_{X/P}$: fator de conversão de fósforo em célula (mg X. mg P^{-1});
 X₀: concentração inicial de biomassa (mg.L^{-1});
 X: concentração final de biomassa (mg.L^{-1});
 N₀: concentração inicial de nitrogênio (mg.L^{-1});
 N: concentração final de nitrogênio (mg.L^{-1});

P_0 : concentração inicial de fósforo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

P : concentração final de fósforo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Teste de toxicidade

Este teste preliminar teve por intuito identificar se a concentração de nutriente praticada poderia causar a inibição do crescimento dos organismos avaliados. Para tal, foi usado o meio sintético proposto por Bergmann et al. (2000), que já havia sido testado no trabalho de Bertolin et al. (2005) para a cianobactéria *Spirulina platensis*.

Com 10 dias de cultivo, o crescimento das três espécies de microalgas já era evidenciado pela coloração verde nos frascos. Entretanto, para *H. phuvialis*, nas maiores concentrações (100% e 80%), foi verificada a coloração avermelhada do cultivo, em decorrência da formação de cistos constituídos por astaxantina. Assim, acredita-se que a microalga foi imposta uma condição de estresse (GUIGGI, 2007), já que haviam altas concentrações dos nutrientes fosfato e amônio no meio. O crescimento de *C. vulgaris* e *S. quadricauda* era esperado, já que as mesmas são frequentemente encontradas em ambientes eutróficos.

O resultado obtido com a realização deste teste foi crescimento positivo para todas as concentrações avaliadas para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. phuvialis*. Diferindo dos resultados obtidos por Bertolin et al. (2005), não foi verificada a necessidade de diluição do meio de cultivo para as microalgas avaliadas.

Juntamente com este experimento, foi verificada a viabilidade do meio de cultivo perante diferentes maneiras de esterilização. Para tal, realizou-se a esterilização por calor úmido sob pressão (conforme descrito no item 4.1) e mediante a filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 μm . Para ambos os modos de esterilização referidos, foram encontrados crescimento positivo para as espécies avaliadas, desde que os sais estejam perfeitamente solubilizados, permitindo a disponibilidade dos nutrientes para as microalgas.

Com o crescimento positivo obtido em todas as concentrações testadas, bem como para o modo de esterilização, foram escolhidas as condições para a realização dos experimentos seguintes: concentração de 100% do efluente sintético suíno e esterilização através de calor úmido sob pressão.

5.2. Crescimento das Microalgas em Diferentes fontes de Nitrogênio Diante das características do efluente da planta da Estação de

Tratamento de Dejetos Suínos da EMBRAPA (item 4.3), foi necessário realizar um teste para verificar a utilização de diferentes compostos nitrogenados (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) pelas microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis*. Foi encontrado como resultado o crescimento positivo das três espécies de microalgas avaliadas, demonstrando assim a utilização das fontes de nitrogênio encontradas no efluente real.

Segundo consta na literatura e corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, outras espécies de microalgas, como *Ankistrodesmus gracilis* e a *Microcystis ponniformis*, apresentaram crescimento para todas as fontes nitrogenadas avaliadas. Foram observadas velocidades de crescimento superiores para o amônio como fonte de N e uma maior concentração de biomassa com o nitrato (ALMEIDA, 2007). No trabalho de Silva (2006) foi verificado o crescimento de *C. vulgaris* para a concentração de $0,23 \text{ mg.L}^{-1}$ de N-NO_2^- .

Partindo dos resultados encontrados, é possível afirmar que as microalgas avaliadas crescem em diferentes fontes nitrogenadas, seja amônio, nitrito ou nitrato. Assim sendo, são adequadas para a remoção dos compostos nitrogenados presentes nos efluentes estudados neste trabalho.

5.3. Resultado da Avaliação do Crescimento das Microalgas em Efluente Sintético

Durante este experimento os nutrientes amônio e fosfato foram acompanhados diariamente para cada microalga, além da concentração de biomassa avaliada ao longo do cultivo, conforme apresentado na Figura 14 e da concentração de clorofila *a*, apresentada na Figura 15.

Figura 14- Acompanhamento do crescimento a partir da concentração de biomassa (mg.L^{-1}) e da remoções dos nutrientes PO_4^{3-} e NH_4^+ (mg.L^{-1}) das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo.

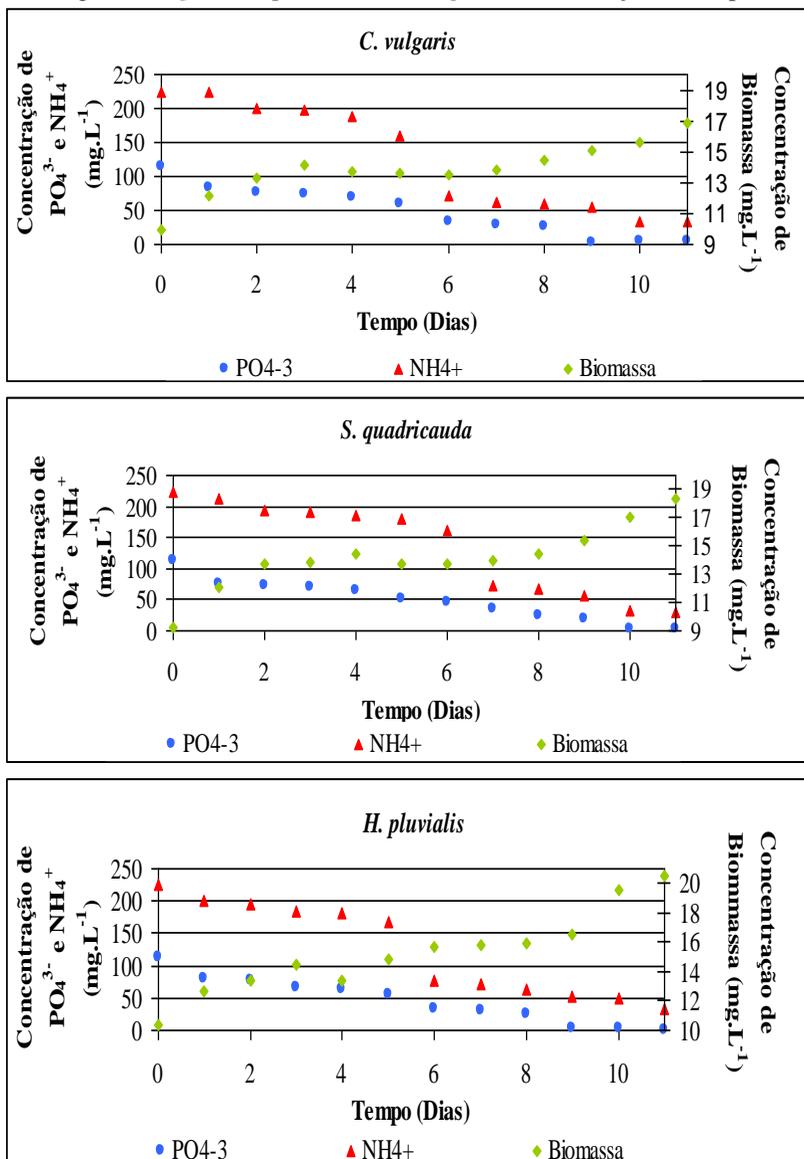
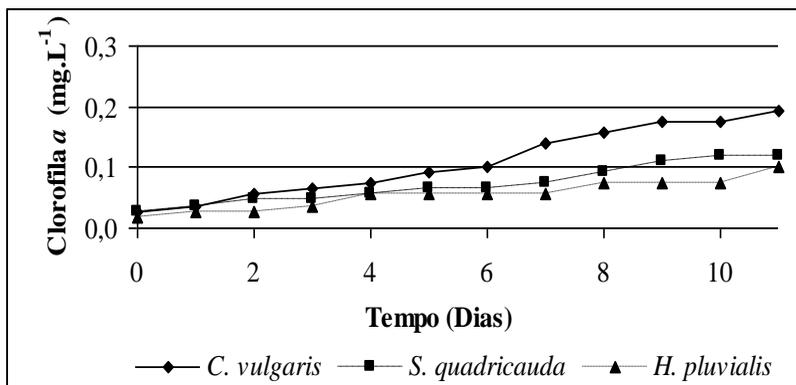


Figura 15- Acompanhamento da concentração de clorofila *a* ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo.



Durante o cultivo, a microalga *C. vulgaris* apresentou o seguinte comportamento, cresceu ao longo do tempo, atingindo uma concentração de biomassa igual a $16,85 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Como o crescimento, houve o aumento da concentração de clorofila *a* chegando até $0,203 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 15. Para que ocorresse o crescimento, a microalga promoveu a remoção de 86 % de NH_4^+ ($191,69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e 96 % de PO_4^{3-} , restando $4,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ deste composto ao fim do cultivo, porém considerando-se apenas a molécula de fósforo contida no fosfato, inicialmente era encontrado $27,77 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e ao fim do cultivo restou $1,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ P- PO_4^{3-} .

O mesmo comportamento foi observado para outras microalgas. *S. quadricauda* atingiu a biomassa máxima com $18,35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, a clorofila *a* chegou a $0,101 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 15) e as remoções foram iguais a 87 % ($194,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) para o amônio e 98 % ($111,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de fosfato. *H. pluvialis* obteve a biomassa de $20,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, com a clorofila *a* chegando a $0,250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 15) e removeu 86 % ($192,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de NH_4^+ e 99 % ($112,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de PO_4^{3-} .

Como pode ser visualizada na Figura 14, a fase lag dos cultivos não foram observadas após 24h, indicando que as microalgas se adaptaram rapidamente ao meio de cultivo e às concentrações presentes neste, conforme mencionado por Martinez et al. (2000). Entretanto, as concentrações de biomassas obtidas no presente trabalho, foram inferiores às reportadas por Bertolin et al. (2005), onde foi atingida a concentração de $0,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Da mesma forma, foi observada uma baixa concentração de clorofila *a*, quando comparamos com o trabalho de

Aslan e Kapdan (2006), que observaram uma relação entre a presença de clorofila *a* e a intensidade luminosa, atingindo concentração próxima de 20 mg.L⁻¹.

Partindo-se dos resultados obtidos após a avaliação estatística para a concentração de biomassa e clorofila *a*, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as microalgas estudadas ao longo do cultivo, conforme mostrado nos Anexos (2 e 23) e (8 e 24) respectivamente.

Já para a remoção dos nutrientes é possível afirmar que *H. pluvialis* atingiu a maior remoção de fosfato, enquanto *S. quadricauda* foi superior para a remoção de amônio. Segundo a análise estatística realizada, as três microalgas avaliadas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para ambos os nutrientes do trabalho, conforme apresentado nos Anexos (4 e 26) e (6 e 25) respectivamente. Apesar de ter sido removido mais de 80% do amônio presente no meio, não foi atingida a concentração estipulada como limite para o lançamento de efluentes pela resolução n° 357 do CONAMA (20 mg de N), o mesmo pode ser observado para o fósforo, já que a legislação estipula entre 0,02 a 0,1 mg.L⁻¹, variando conforme a classificação da água. Entretanto, foram encontrados valores de remoção superiores aos demonstrados no trabalho de Aslan e Kapdan (2006) para efluentes sintéticos, onde a remoção máxima observada foi em torno de 24 % para N-NH₄ e 30 % para o P-PO₄, sendo observada uma relação entre a concentração inicial do nutriente e a eficiência de remoção.

A partir das curvas obtidas nas Figuras 14, calcularam-se os parâmetros cinéticos para os três cultivos das algas estudadas, encontrando-se os mesmos na Tabela 6.

Tabela 6- Velocidades de crescimento (K), velocidade de consumo de substrato para PO₄⁻³ (μ_sP) e também para NH₄⁺ (μ_sN), para *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis*

Microalgas	K (divisões. d ⁻¹)	μ _s P (d ⁻¹)	μ _s N (d ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	0,07	0,14	1,93
<i>S. quadricauda</i>	0,09	0,27	1,51
<i>H. pluvialis</i>	0,15	0,24	1,33

Tabela 7. Valores dos fatores de conversão de fosfato em célula ($Y_{X/P}$), nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$) e produtividade (P_x) para *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis*.

Microalgas	$Y_{X/P}$ (mg X.mg P)	$Y_{X/N}$ (mg X.mg N ¹)	P_x (mg X. L ⁻¹ . d ⁻¹)
<i>C. vulgaris</i>	0,26	0,05	0,63
<i>S. quadricauda</i>	0,33	0,06	0,82
<i>H. pluvialis</i>	0,36	0,07	0,93

Interpretando os dados fornecidos pela Tabela 7, como o consumo de substrato e os fatores de conversão, podemos verificar que a microalga *C. vulgaris* conseguiu consumir os substratos amônio e fosfato mais rapidamente que as demais microalgas, embora não tenha atingido a melhor remoção, conforme verificado na Tabela 8. Observando os valores de fatores de conversão é possível justificar a baixa obtenção de biomassa, já que os resultados encontrados foram baixos, segundo os resultados obtidos, *H. pluvialis* converteu mais rapidamente o nutriente fosfato em células, quando comparadas às outras microalgas avaliadas, o mesmo pode ser observado para o nutriente amônio.

Tabela 8- Valores obtidos de remoção para os íons PO_4^{3-} e NH_4^+ durante o experimento com efluente sintético

Microalgas	Biomassa (mg. L ⁻¹)	Remoção PO_4^{3-} (%)	Remoção NH_4^+ (%)
<i>C. vulgaris</i>	6,7	96	86
<i>S. quadricauda</i>	9,07	98	87
<i>H. pluvialis</i>	10,2	99	86

Avaliando os resultados obtidos e relacionando as remoções dos nutrientes e seus respectivos fatores de conversão com a concentração de biomassa, pode-se inferir a ocorrência do fenômeno conhecido como “absorção de luxo” no presente experimento. Este está relacionado com a capacidade das microalgas em incorporar nutrientes, principalmente o fósforo inorgânico e armazená-lo no interior das células, quando as concentrações estão elevadas no meio (PERFETO et al., 2005). Esta absorção de fósforo é influenciada pela concentração de fosfato das águas residuais, luz, temperatura, (POWELL et al., 2009) e o tempo de

incubação. Esta acumulação de polifosfato causa um rendimento minimizado de biomassa, devido à alta concentração do nutriente no meio (WU et al., 2012).

5.4. Caracterização do efluente real

Os resultados encontrados para as análises de caracterização do efluente da ETDS da EMBRAPA Aves e Suínos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Resultado da caracterização do efluente suíno proveniente da estação de tratamento de dejetos suínos da EMBRAPA, Concórdia, SC.

Variáveis	Concentrações (mg.L ⁻¹)
Sólidos Totais	265
Sólidos Voláteis	150
Amônio	80,52
Nitrato	64,55
Nitrito	102,95
Fosfato	45,95
DQO	547,47
Alcalinidade	12
Coloração	Marrom claro

A partir da observação da Tabela 9, é possível estabelecer uma relação entre os valores obtidos e a planta da estação de tratamento apresentada na Figura 12. Destacando os nutrientes nitrogenados e o fosfato que serão avaliados neste trabalho, é verificado que no reator RBA ocorrem reações que promovem a oxidação do nitrogênio amoniacal em nitrito e nitrato, através do processo de nitrificação. Por essa razão, são encontrados menores valores de amônio (80,5 mg.L⁻¹), quando comparado ao nitrito (102,9 mg.L⁻¹). Já o nitrato (64,5 mg.L⁻¹), é proveniente da oxidação do nitrito.

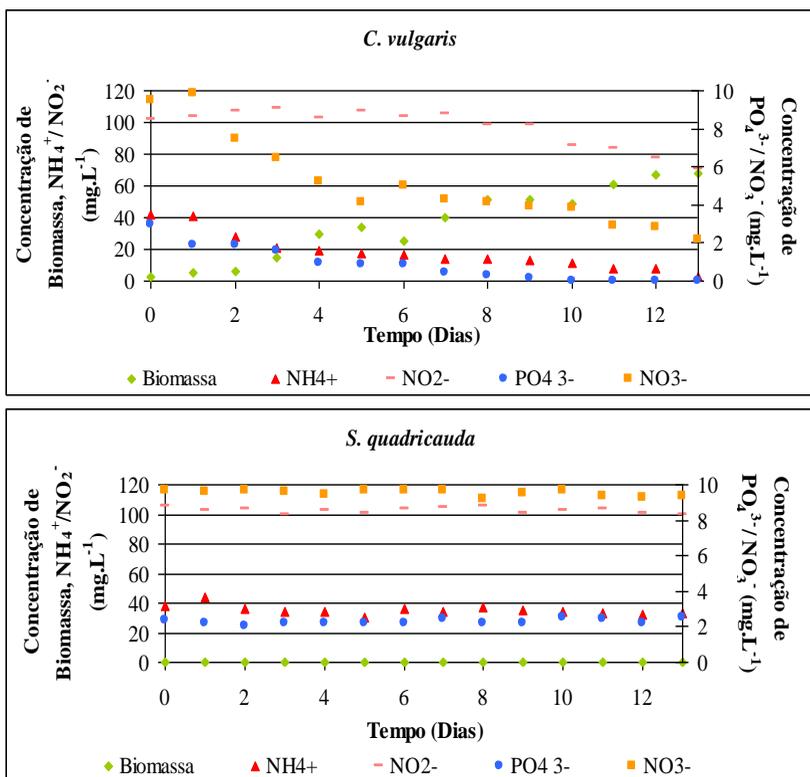
É importante ressaltar que as altas concentrações de amônio e de nitrito indicam que a nitrificação neste reator é parcial e que pode causar efeito tóxico a microrganismos de processos complementares de

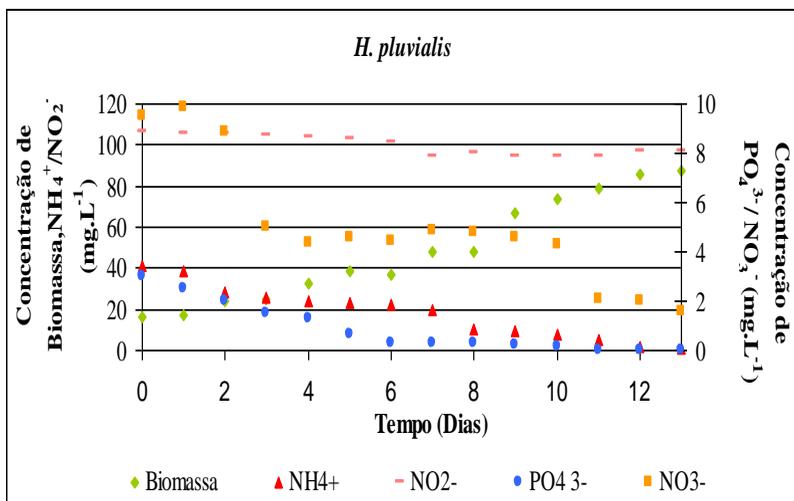
tratamento, além de ficarem muito aquém dos estipulados pela legislação. Assim busca-se por alternativas que promovam a remoção dos nutrientes restantes e não comprometam o meio ambiente e a saúde pública.

5.5. Avaliação do Crescimento das Microalgas em Efluente da Suinocultura

A partir do acompanhamento diário do cultivo em efluente real foi construída a Figura 16, que propicia uma visão geral do cultivo individual de cada microalga.

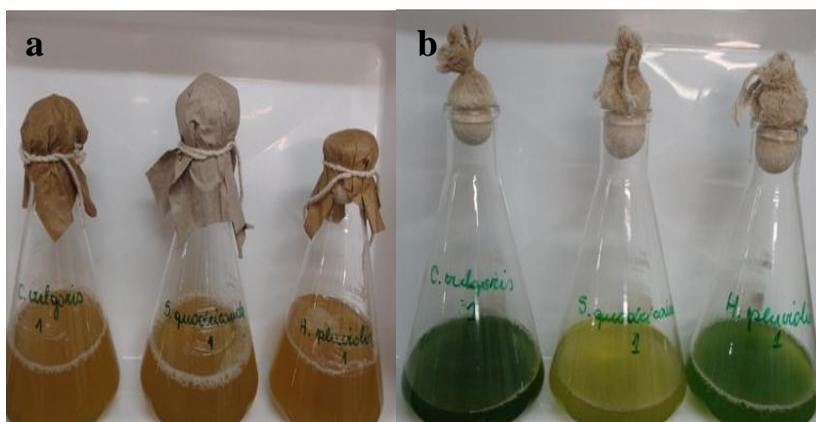
Figura 16- Acompanhamento do cultivo das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* para as análises de biomassa (mg.L^{-1}), PO_4^{3-} (mg.L^{-1}), NH_4^+ (mg.L^{-1}), NO_2^- (mg.L^{-1}) e NO_3^- (mg.L^{-1}) do experimento com efluente suíno em função do tempo.





A partir da Figura 16 é possível observar que as microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* cresceram em efluente real suíno, diferente de *S. quadricauda* que não cresceu e assim não promoveu a remoção dos nutrientes. Essa informação é passível de ser verificada na Figura 17, onde se observa o efluente antes de ser inoculado pelas microalgas e ao fim do experimento, possibilitando a visualização e a diferença para os cultivos com crescimento e sem crescimento.

Figura 17- Comparação entre os efluentes reais antes e depois da inoculação das microalgas. Em a) meio após ser autoclavado sem inóculo e em b) ao fim do cultivo.

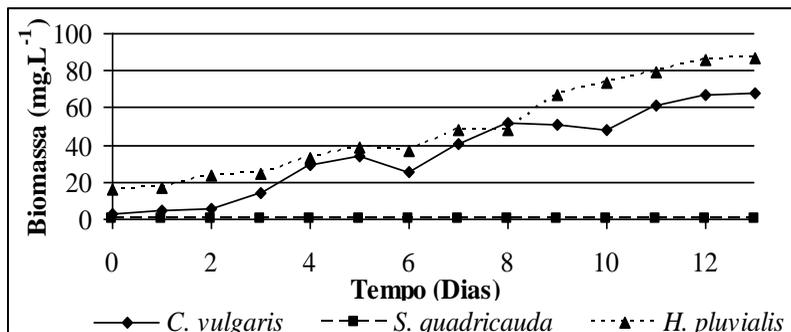


Para uma melhor discussão, cada componente será avaliado individualmente a seguir e serão realizadas as considerações para cada caso.

5.5.1 Avaliação da Concentração de Biomassa e Clorofila *a*

O crescimento das microalgas é indicado na Figura 18 através da concentração de biomassa presente no efluente suíno. Assim, verifica-se que as mesmas permaneceram em fase lag por aproximadamente 24h para a *H. pluvialis* e de 48h para *C. vulgaris*, até ser observado um crescimento mais representativo no terceiro dia. Diferente do observado no efluente sintético, em efluente suíno as microalgas apresentaram um período de adaptação, este fato pode ter ocorrido pela elevada concentração de nitrito presente no efluente. A mesma forma de crescimento foi observada nos trabalhos realizados por Kim et al. (2010) e Marin (2010), porém, com concentrações superiores de biomassa, em torno de 120 mg.L⁻¹ para as microalgas *C. vulgaris* e *S. quadricauda* em efluente doméstico.

Figura 18- Avaliação da concentração de biomassa (mg.L⁻¹) das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo.



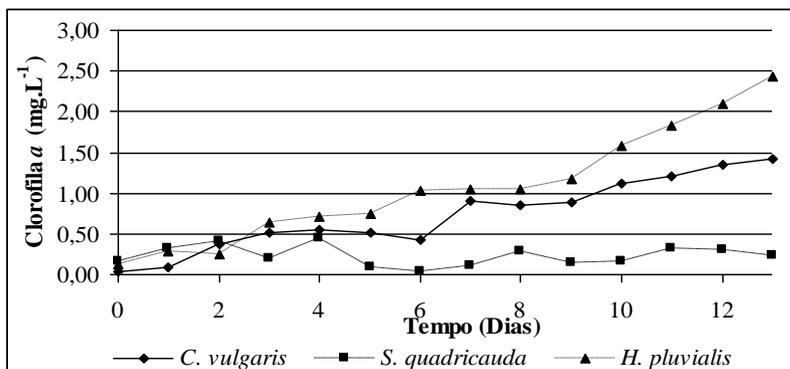
Para realizar um comparativo do crescimento de *H. pluvialis*, só foi encontrado o trabalho de Kang et al. (2006), que foi realizado em efluente suíno concentrado, porém, não foi observado crescimento. Por essa razão, foram realizadas diluições do efluente, onde então foi verificado o crescimento da microalga.

A microalga que obteve a maior biomassa foi *H. pluvialis* com 70,9 mg.L⁻¹ seguido da *C. vulgaris* com 65,21 mg.L⁻¹. Este resultado merece atenção, já que esta microalga apresentou comportamento

semelhante a outras espécies difundidas no tratamento de efluente e superou a produção de biomassa. Porém, estatisticamente esta diferença de biomassa não apresentou significância para $p < 0,05$, sendo constatada a diferença apenas para a microalga *S. quadricauda*, já que não houve crescimento, conforme apresentado nos Anexos 9 e 27.

A análise de clorofila *a* apresenta como resultado uma relação proporcional com o crescimento do micro-organismo, já que cada microalga contém em sua célula a presença deste pigmento, correspondendo a aproximadamente 1% do peso seco (APHA, 2005), conforme visualizada na Figura 19. A microalga que apresentou a maior concentração de clorofila *a* foi *H. pluvialis* com $2,31 \text{ mg.L}^{-1}$, seguida de *C. vulgaris* com $1,38 \text{ mg.L}^{-1}$. Comparando as concentrações encontradas neste trabalho, com o resultado de Rodrigues e Belli Filho (2004), é verificado que os referidos autores obtiveram uma concentração inferior de clorofila *a* para a *C. minutissima* em dejetos suíno, próximo de $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, devido a diferenças no cultivo.

Figura 19- Concentração de clorofila *a* (mg.L^{-1}) das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo no experimento com efluente suíno real.



Com o resultado da análise estatística demonstrado nos Anexos 20 e 28, é possível identificar que não houve diferença significativa estatística ($p < 0,05$) nas primeiras 24h, posteriormente, verifica-se que há diferença entre *C. vulgaris* e *S. quadricauda*, sendo que *H. pluvialis* foi semelhante às duas microalgas referidas. A partir do terceiro dia, *C. vulgaris* e *H. pluvialis* mantiveram-se iguais até o fim do cultivo.

Neste experimento também foram encontrados valores de concentração de biomassa e clorofila *a* inferiores aos apresentados por

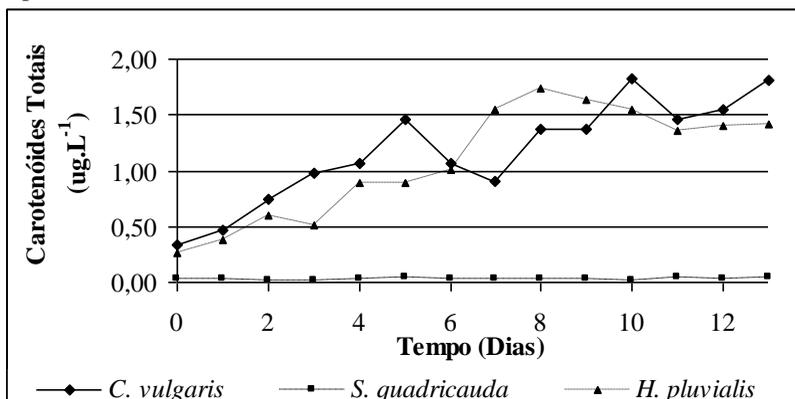
outros estudos. Entanto, este fato pode ter sido causado pela alta turbidez e a coloração escura do efluente, o que promove uma diminuição da penetração da luz e conseqüente redução do processo fotossintético pelas clorofilas presentes e assim não é observado crescimento ou este é mais baixo (VENKATAMAN et al., 1982).

5.5.2. Avaliação de Carotenóides

Esta análise foi desenvolvida com o intuito de verificar se *H. pluvialis*, havia produzido o carotenóide astaxantina às condições impostas, já que é o principal carotenóide encontrado em meio aquático (GUERIN et al., 2003). Porém, com os resultados apresentados na Figura 20 verifica-se que a microalga *C. vulgaris* apresentou a maior concentração de carotenóide com $1,81 \mu\text{g.L}^{-1}$, seguido de *H. pluvialis* com $1,41 \mu\text{g.L}^{-1}$. O resultado obtido neste trabalho está de acordo com a literatura, onde é relatado que em células vegetativas de *H. pluvialis*, são encontradas maiores concentrações de clorofila (*a* e *b*) e menos carotenóides. Dentre estes, a astaxantina compreende em torno de 88% do conteúdo de carotenóides totais (KAMATH et al., 2005).

Para a análise de carotenóides totais, foi observada diferença significativa estatística ($p > 0,05$) a partir do nono dia de cultivo, sendo que *H. pluvilis* se diferiu de *S. quadricauda*, enquanto *C. vulgaris* apresentou concentração igual às outras microalgas do experimento, estes dados são apresentados nos Anexos 22 e 29.

Figura 20- Concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g.L}^{-1}$) em função do tempo de cultivo para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis*, no experimento com efluente suíno real.

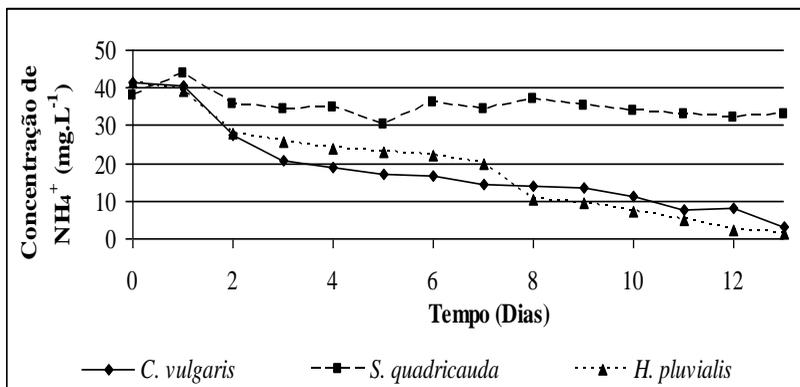


5.5.3 Avaliação da Remoção de Nutrientes (NH_4^+)

O nutriente NH_4^+ é a forma mais reduzida dos compostos nitrogenados e por essa razão é mais facilmente assimilado pelas microalgas. Assim com os resultados obtidos, *H. pluvialis* promoveu a maior remoção do nutriente 97 % ($40,3 \text{ mg.L}^{-1}$), já *C. vulgaris* removeu 93 % ($38,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Estas remoções são iguais ou superiores às encontradas na literatura, já que Wang et al. (2012) apresentaram 95 % para um efluente com concentração superior amônia com *C. pyrenoidosa*, assim como González et al. (1997) com *C. vulgaris* e *S. quadricauda* que removeram mais de 95% de amônia do efluente. A mesma remoção foi atingida por Kong et al. (2010) e de Rodrigues (2000), utilizando as microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e *C. vulgaris* respectivamente.

As curvas dos valores de nitrogênio amoniacal determinados durante o experimento podem ser visualizadas na Figura 21.

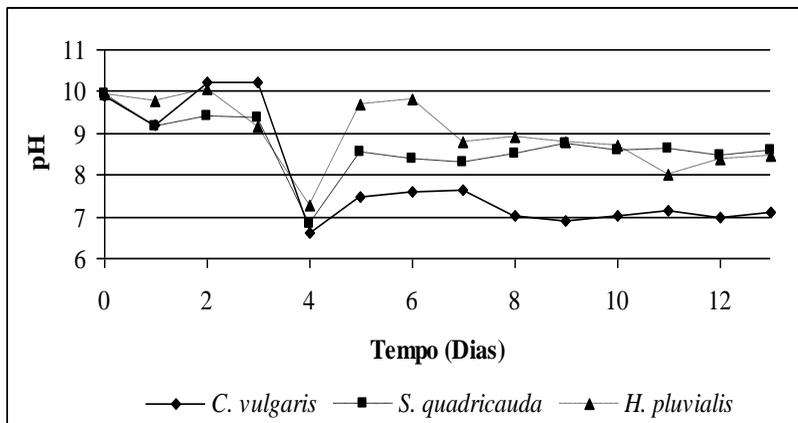
Figura 21- Remoção do nutriente amônio em função do tempo de cultivo para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* avaliadas no experimento com efluente suíno real.



A partir das curvas de remoção do nutriente, é possível verificar que a microalga *S. quadricauda*, embora não tenha crescido, reduziu cerca de 13% o valor final de NH_4^+ . Para explicar este dado, vamos relacionar com o pH do cultivo ao longo do tempo, conforme a Figura 22. Quando as microalgas foram inoculadas, o pH estava próximo de 10, nesta faixa, o equilíbrio das formas de nitrogênio é em 9,3, abaixo deste, o equilíbrio favorece a formação de NH_4^+ e acima a formação de NH_3 .

Considerando que a temperatura ao longo do sistema permaneceu constante (GERRARDI, 2002), acredita-se que ocorreu a volatilização de NH_3 em função do pH do efluente.

Figura 22- Acompanhamento do pH no meio de cultivo ao longo do tempo para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* avaliadas no experimento com efluente real.



Para que não houvesse aumento do pH, no quarto dia foi adicionado ácido em concentrações baixas para reduzi-lo. Entretanto, as microalgas são conhecidas pela produção de íons hidroxila (OH^-), quando o íon bicarbonato é consumido para a fotossíntese, segundo a reação: $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$ (PRINS et al., 1980; AZOR, 1982). Assim, o aumento de pH ao longo do experimento pode ser indicativo do consumo de carbono por parte das microalgas, segundo Lee (2006) e por essa razão ocorreu o aumento do pH novamente.

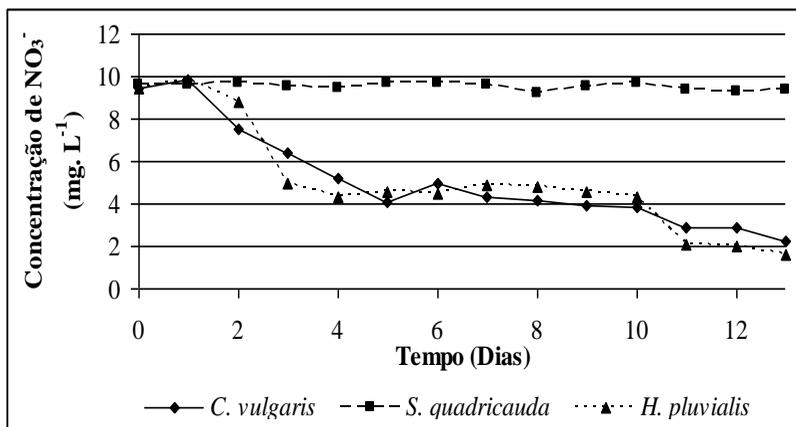
Não podemos considerar a remoção deste nutriente apenas em função do pH, haja vista a realização de análises diárias. Desta forma, a microalga *S. quadricauda* que não apresentou crescimento neste efluente manteve alta a concentração de amônio, considerando também que os valores de pH estão de acordo com o trabalho de Wang et al. (2012) e de Rodrigues (2000).

Comparando os valores de remoção ao longo do cultivo para as microalgas usadas no experimento, verificou-se que *C. vulgaris* e *H. pluvialis* foram diferentes estatisticamente para $p > 0,05$, a partir do terceiro dia de cultivo e esta se manteve até o fim do mesmo, conforme apresentado nos Anexos 12 e 30.

5.5.4. Avaliação da Remoção de Nutrientes (NO_3^- e NO_2^-)

Os resultados das concentrações dos íons nitrito e nitrato ao longo do tempo nos experimentos utilizando o efluente real estão apresentados nas Figuras 23 e 24, respectivamente. Avaliando o comportamento das microalgas utilizadas para o experimento, frente aos nutrientes nitrato e nitrito, verifica-se que aquelas que apresentaram as maiores remoções foram: *H. pluvialis* para o nitrato, com 83 % ($7,8 \text{ mg.L}^{-1}$), seguido de *C. vulgaris* com 77 % ($7,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e para o nitrito *C. vulgaris* removeu 30 % ($31,9 \text{ mg.L}^{-1}$), enquanto *H. pluvialis* removeu 10 % ($9,2 \text{ mg.L}^{-1}$).

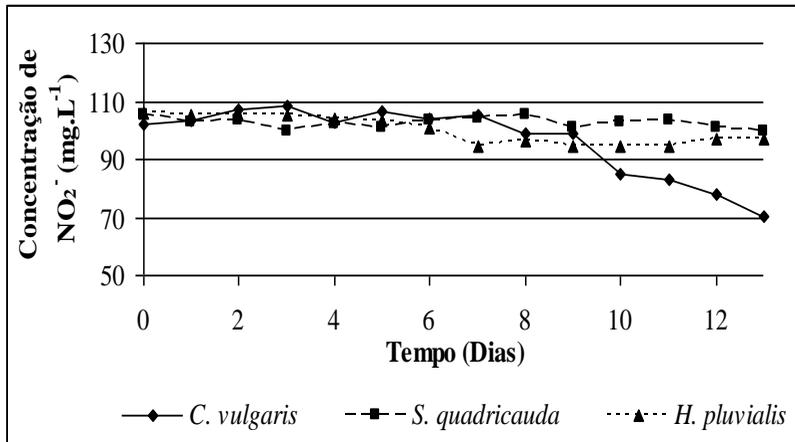
Figura 23- Avaliação da remoção do nutriente nitrato (mg.L^{-1}) pelas microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.



Devido à baixa concentração inicial de nitrato no efluente, acreditava-se que o mesmo seria removido por completo. Entretanto, neste efluente encontramos uma elevada concentração de nitrito, o que pode ter promovido uma inibição na assimilação de nitrato. Esta observação foi feita por Garbayo et al. (2000) que verificou em *Chlamydomonas reinhardtii* a inibição do consumo de nitrato, perante a concentração de nitrito. Przytocka-Jusiak et al. (1984), observaram que a microalga *C. vulgaris* possui preferência por formas reduzidas de nitrogênio, criando assim uma tendência para que as formas oxidadas permaneçam meio. Assim, esta pode ser outra hipótese encontrada para a permanência de 2,2 mg de nitrato no meio para *C. vulgaris* e 1,6 mg

para *H. pluvialis*, já que o amônio não foi 100% removido do efluente, além da falta de fósforo no efluente, já que as microalgas já o haviam consumido.

Figura 24- Avaliação da remoção do nutriente nitrito (mg.L^{-1}) pelas microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.



Conforme foi possível verificar ao longo dos resultados demonstrados, a microalga *S. quadricauda* não apresentou crescimento no efluente real suíno, e por essa razão não houve remoção dos nutrientes presentes no meio. A explicação encontrada para este fato é a concentração de nitrito, que pode provocar a inibição do crescimento algal (ABE et al., 2002; YANG et al., 2004), além de inibir o funcionamento de algumas enzimas e reações fotossintéticas (CHEN et al., 2010). Porém, a referida concentração não foi suficiente para inibir o crescimento das microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis*, embora não tenha ocorrido uma alta remoção, comparada aos outros nutrientes. Este fato pode ser atribuído à preferência por fontes de nitrogênio já relatadas e quando estas estão presentes no mesmo meio, a maioria das espécies de micro-organismos segue a ordem: amônio > nitrato > nitrito > uréia (PEREZ-GARCIA et al., 2010).

A preferência relatada por Perez-Garcia (2010), não foi observada no teste com diferentes fontes de nitrogênio, pois estas foram avaliadas individualmente e não no mesmo meio. Para o mesmo teste, houve o crescimento de *S. quadricauda* utilizando NO_2^- como fonte de

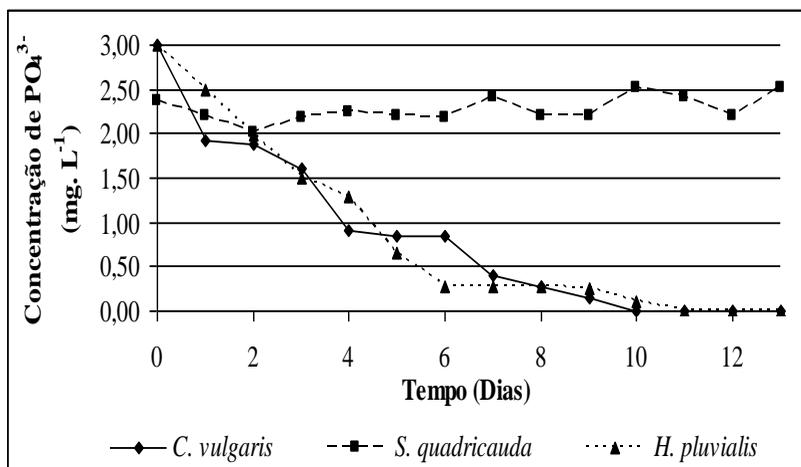
nitrogênio, entretanto foram utilizadas concentrações inferiores do nutriente, não provocando desta forma a inibição do crescimento.

A partir da análise estatística dos resultados obtidos para o nitrato, verifica-se *C. vulgaris* e *H. pluvialis* diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) de *S. quadricauda* a partir do quarto dia de cultivo. Porém, não apresentaram diferença entre si até o fim do experimento como mostrado nos Anexos 14 e 31. Comportamento diferente foi verificado na análise estatística do nitrito, em que foi constatada diferença entre as três microalgas testadas a partir do décimo dia, como apresentado nos Anexos 16 e 32.

5.5.5. Avaliação da Remoção de Nutrientes (PO_4^{3-})

Os resultados das concentrações do íon fosfato ao longo do tempo nos experimentos utilizando o efluente real estão apresentados na Figuras 25. Os resultados indicam que as microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* conseguiram remover de maneira eficiente todo o fosfato presente no meio, representando uma remoção de 100% para este nutriente. Fato este que pode justificar a permanência de nutrientes nitrogenados no meio, já que não havia mais a relação adequada de N:P no efluente, para que fossem completamente removidos.

Figura 25- Avaliação da remoção do nutriente fosfato ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) pelas microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo de cultivo em efluente suíno real.



Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Kang et al. (2006), em que a microalga *H. pluvialis* removeu 100 % do fosfato presente no meio com concentração inicial de 10 mg.L⁻¹ no efluente suíno diluído. Já no trabalho de Wang (2012) a remoção máxima atingida foi de 77% de fósforo total, obtido com o crescimento mixotrófico da microalga *C. pyrenosa* com efluente suíno diluído. No trabalho desenvolvido por Li (2011) com *C. vulgaris* foi removido 89 % do fosfato presente no efluente, porém, o efluente era de esgoto doméstico.

Análise estatística realizada a partir dos resultados obtidos demonstra que houve diferença estatística entre *C. vulgaris* e *H. pluvialis* e a microalga *S. quadricauda*. Esta foi significativa ($p > 0,05$) a partir do dia 7. Porém, foi verificada uma variação de significância, sendo que ao fim do cultivo as microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* apresentam remoção significativa e igual, já que ambas consumiram todo o fosfato. A visualização deste teste pode ser feita a partir dos valores encontrados nos Anexos 18 e 33.

5.5.6. Velocidades de Crescimento e de Consumo de Nutrientes

Com os valores obtidos a partir dos cálculos dos balanços de massa e da velocidade de consumo de substrato, foi construída a Tabela 10. Nesta, é possível observar algumas características do comportamento cinéticos destas microalgas frente aos desenvolvimentos em substrato real da suinocultura. Apesar de *H. pluvialis* ter obtido a maior concentração de biomassa, assim como a maior remoção de amônio e nitrato, as velocidades de crescimento e de consumo de substrato para todos os nutrientes avaliados neste experimento foram maiores para *C. vulgaris*. Com estes dados é possível inferir que a remoção não está necessariamente relacionada com a velocidade de consumo dos substratos e com o crescimento da microalga. Entretanto, a produtividade foi um pouco maior para *H. pluvialis*, já que existe a relação deste com a produção de biomassa, ou seja, representa o quanto de biomassa foi gerada por litro de cultivo em apenas um dia.

Tabela 10- Resultados obtidos a partir dos cálculos da velocidade de crescimento (K) e velocidade de consumo de substrato (μ_s) cada uma das microalgas avaliadas.

Microalgas	$\mu_s P$ (d^{-1})	$\mu_s N$ (d^{-1})	K (divisões.dia $^{-1}$)
<i>C. vulgaris</i>	0,0008	0,05	0,35
<i>S. quadricauda</i>	0,0000	0,00	0,00
<i>H. pluvialis</i>	0,0007	0,04	0,19

Os valores dos fatores de conversão (Tabela 11) demonstraram mesma tendência indicada acima, ou seja, *C. vulgaris* aproveitou melhor os nutrientes, tanto o fósforo como o nitrogênio, transformando-os em células. Desta forma, é possível perceber que os valores de conversão dos nutrientes em células não condizem com as remoções obtidas no experimento, pois *H. pluvialis* removeu aproximadamente 10 % de nitrito, enquanto *C. vulgaris* removeu 30 %, conforme visualizado na Tabela 11. Os valores apresentados na Tabela 10 estão relacionados com as condições impostas às microalgas durante o cultivo, bem como o tempo de retenção hidráulica (TRH), já que estes cálculos levam em consideração o tempo em que as células ficaram em contato com os nutrientes presentes no efluente (MACGINN et al., 2012).

Tabela 11- Resultados dos fatores de conversão obtidos através do cálculo do consumo de substrato para cada composto inorgânico avaliado para as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no efluente real.

Microalgas	$Y_{X/P}$ (mg X. mg P $^{-1}$)	$Y_{X/N}$ (mg X. mg N $^{-1}$)	P_x (mgX.L $^{-1}$.d $^{-1}$)
<i>C. vulgaris</i>	89,3	1,58	5,45
<i>S. quadricauda</i>	0,00	0,00	0,00
<i>H. pluvialis</i>	97,1	1,97	5,01

Tabela 12- Resultados encontrados para a remoção dos nutrientes (%) e a concentração de biomassa (mg.L^{-1}) das microalgas avaliadas no experimento com efluente real.

Microalgas	Biomassa (mg.L^{-1})	Remoção Fosfato (%)	Remoção Amônio (%)	Remoção Nitrato (%)	Remoção Nitrito (%)
<i>C. vulgaris</i>	65,21	100	93	31	77
<i>S. quadricauda</i>	0,0	0	13	5	3
<i>H. pluvialis</i>	70,9	100	97	9	83

Com os resultados do presente trabalho, observa-se uma boa alternativa para o tratamento terciário de efluente suíno o uso de microalgas das espécies *C. vulgaris* e *H. pluvialis*. Segundo Przytocka-Jusiak (1984) estes micro-organismos apresentam vantagens quando comparados às bactérias nitrificantes, já que são mais resistentes à presença de diferentes compostos químicos, incluindo metais pesados. Assim, é preciso considerar as características do efluente, para então ser escolhida de maneira adequada à microalga capaz de realizar o tratamento de acordo com a exigência da planta da estação de tratamento e segundo os interesses relacionados após a colheita das microalgas. Para promover a separação das microalgas do efluente é mais interessante o uso de células maiores e que possam ser removidas com maior facilidade do sistema, além de poderem agregar valor ao processo através da produção de biomassa. A eficiente remoção dos nutrientes e as baixas produções de biomassa são conhecidas para as águas residuárias de alta resistência (SU et al., 2012). A baixa concentração de biomassa obtida pode ser vista como uma vantagem do sistema, pois facilita a separação das células e do efluente final.

6. CONCLUSÕES

- O teste de toxicidade permitiu identificar a concentração de 100% para o experimento com o efluente sintético, não sendo observada a inibição do crescimento microalgal.
- As microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* cresceram em efluente sintético e promoveram a remoção dos nutrientes presentes no meio.
- As microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* produzem pouca biomassa algal (mg.L^{-1}) sob as condições estipuladas de 25°C, 24h de fotoperíodo, 56 μmol de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa com de 11 dias de cultivo.
- As microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* conseguem utilizar diferentes fontes nitrogenadas (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) como única fonte de nitrogênio.
- *S. quadricauda* não apresentou crescimento no efluente da suinocultura.
- As microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* são passíveis de realizarem o tratamento de efluentes de dejetos suínos, promovendo a remoção dos nutrientes NH_4^+ (93% e 97%), NO_2^- (31% e 9%), NO_3^- (77% e 83%), PO_4^{3-} (100% e 100%). Assim *H. pluvialis* promoveu a maior remoção dos nutrientes amônio e nitrato, *C. vulgaris* removeu mais nitrito e ambas removeram igualmente o fosfato.
- As microalgas *C. vulgaris* e *H. pluvialis* produzem pouca biomassa algal (mg.L^{-1}) sob as condições estipuladas de 25°C, 24h de fotoperíodo, 56 μmol de fótons. $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa com 13 dias de cultivo.
- *C. vulgaris* obteve os melhores as melhores velocidades de crescimento (K) e também a melhor velocidade de consumo de substrato (μ_s) no experimento com efluente real.

7. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Realizar o cultivo com as microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no efluente de saída do biodigestor (UASB) da ETDS da EMBRAPA para verificar as remoções de nutrientes sem que haja uma concentração alta de nitrito.

Avaliar e quantificar o carotenóide Astaxantina produzido pela microalga *H. pluvialis* ao longo do tratamento dos efluentes aeróbio e anaeróbio ETDS da EMBRAPA .

Realizar o cultivo destas microalgas em reator tipo *air lift* e verificar as remoções dos nutrientes presentes nos efluentes aeróbio e anaeróbio ETDS da EMBRAPA .

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I. B. M.; SAUDI. Microalgae and wastewater treatment. **Journal of Biological Sciences**, n. 19, p. 57–275, 2012.

ABE, K., IMAMAKI, A., HIRANO, M. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology** 14, 129–134., 2002

ABEL, P.D. Water pollution biology. In: **Ellis Horwood Series in Wastewater Technology**. Ellis Horwood Ltd., John Wiley; Sons, Chichester 1989.

ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A.; MOLINA GRIMA, E. Cost-effective production of ¹³C, ¹⁵N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. **Biomolecular Engineering**, n.22, p.193-200, 2005.

ALMEIDA, C.C.S. Avaliação do crescimento, padrões metabólicos e capacidade fotossintética de *Microcystis panniformes* Komáreco et al.(Cyanobacteria) e *Ankistrodesmus gracilis* (Reish) (Chlorophyta) em fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas. **Dissertação de Mestrado**, UFOP, Ouro Preto, MG, 2007.

AN, J. Y.; SIM, S. J.; LEE, J. S.; KIM, B. W. Hydrocarbon production from secondarily treated piggery wastewater by the green alga *Botryococcus braunii*. **Journal of Applied Phycology**, n.15, p. 185–191, 2003.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21th ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2005.

ASCENCIO, S. D. Heterosídeos Sintetizados por Linhagens de Cor e Estágios Reprodutivos de Macroalgas Vermelhas dos Gêneros *Hypnea* e *Gracilaria*. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, 2006.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological engineering**, n. 28, p. 64–70, 2006.

AZOR, Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, n.43, v. 6, p. 1300-1306, 1982.

BAILEY, R.; CLARK, H.; FERRIS, J.; KRAUSE, S.; STRONG, R.; **Chemistry of the Environment**, 2. ed., San Diego-California, Ed. Elsevier, 835p. 2002.

BARROS, F. F. C.,QUADROS,C.P.,PASTORE,G.M.,Propriedades Emulsificantes e Estabilidade do Biossurfactante Produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 28(4): 979-985, out.-dez. 2009.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J. Appl. Phycol.**, n.5, p.235–241, 1993.

BELLI FILHO, P.; CASTILHOS JR, A. B.; COSTA, R. H. R.; SOARES, S. R. PERDOMO, C. C. Tecnologias para o tratamento de dejetos de suínos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.5, n.1, p.166-170, 2001.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, n.14, p.377-387, 2004.

BERGMANN, B. A.; CHENG, J.; CLASSEN, J.; STOMP, A. M. In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. **Bioresource Technology**, n.73, p. 13-20, 2000.

BERTOLIN, T. B.P.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Culture of the cyanobacteria *Spirulina platensis* using synthetic swine wastewater. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.

BICUDO, C.E.M; MENEZES, M. Gêneros de algas continentais do Brasil (chave para identificação e descrição). 2ed., São Carlos: Editora Rima, 502p, 2006.

BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanotece microscopica Nägelli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono em vinhaça. **Dissertação de Mestrado**, UFSCar, Araras, 2012.

BORGUETTI, I. A. Avaliação do crescimento de *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. Dissertação de Mestrado, UFPR, Curitiba, 2009.

BOROWITZKA, L.J., BOROWITZKA, M.A. Carotene (Provitamin A) production with algae. In: Vandamme, E.J. (Ed.), **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**. Elsevier Applied Science, London, pp. 15–26, 1989.

BORTOLI, M. Partida, operação e otimização de um sistema de nitrificação/desnitrificação visando a remoção de nitrogênio de efluente da suinocultura pelo processo Ludzack-Ettinger modificado. **Dissertação de Mestrado**, UFSC, Florianópolis, 2010.

CANTER-LUND, H.; LUND, J.W.G. **Freshwater Algae: Their Microscopic World Explored**. Hong Kong: Bio press Limited, 1995.

CATOLDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E. e YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Comum Soil Sci Plant Anal**. Vol 6, p.71-80, 1975.

CHEN, W.M., LIU, H., ZHANG, Q.M. Effect of nitrite on growth and microcystins production of *Microcystis aeruginosa* PCC7806. **Journal of Applied Phycology**. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-010-9558-y>.2010.

CHENG, J.; BERGMANN, B. A.; CLASSEN, J. J.; STOMP, A. M.; HOWARD, J. W. Nutrient recovery from swide by *Spirodela punctata*. **Bioresource Technology**, n. 81, p. 81-85, 2002.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by

microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, n.50, p.324-329, 2006.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, n.25, p.294–306, 2007.

CHONG, A.M.Y., WONG, Y.S., TAM, N.F.Y. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial waste water. *Chemosphere* 41, 251–257, 2000.

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas, **Vetor**, 12, p.61 – 78, 2002;

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA N°357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e da outras providencias. Publicado no Diário Oficial da União. 18 março de 2005.

CRAGGS, R.J. Advanced integrated wastewater ponds. In: SHILTON, A. (Ed.), **Pond Treatment Technology**, IWA Scientific and Technical Report Series, IWA, London, UK, p.282–310, 2005.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, n.40, p.158-162, 2006.

DARTORA, V.; PERDOMO, C. C.; TUMELERO, I. T. **Manejo de dejetos suínos**. Concórdia: EMBRAPACNPSA/ EMATER/RS, 41 p., 1998.

DE LA NOÛ, E. J.; DE PAUW, N. The potential of microalgal biotechnology. A review of production and uses of microalgae. **Biotechnol. Adv.**, n. 6, p. 725–770, 1988.

DE PAUW, N.; VAN VAERENBERGH, E. Microalgal wastewater treatment systems: Potentials and limits. In: Ghette, P.F. (Ed.),

Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced. Centro Ric. Produz, Animali, Reggio Emilia, Italy, pp. 211–287, 1983.

DERNER, R. B.; OHSE, N. S.; VILLELA, M.; CARVALHO, M. S.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DETTMER, C. A. Destino dos dejetos suínos em algumas propriedades rurais do município de Nova Boa Vista RS, sob a ótica ambiental: estudo de caso. **Monografia de Especialização**, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2003.

DONG, Q-L; ZHAO, X-M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, v. 98, p. 537–544, 2004.

ELLIOT, A.M. Morphology and the life history of *Haematococcus pluvialis*. **Arch. Protistenk**, v. 82, p.250-272, 1934.

ERIKSEN, N. T. The tecnology of microalgal culturing. **Biothnology Letters**, v.30, p. 1525-1536, 2008.

FAINTUCH, B. L. Análise Comparativa da Produção de Biomassa a Partir de Três Cianobactérias empregando Distintas Fontes Nitrogenadas, **Exame de Qualificação USP**, São Paulo, 1989.

FAST, A.; BOYD, C. Water circulation, aeration and other management pratices. In: FAST, A.; LESTER, J. (Ed.). **Marine shrimp culture: principles and practices.**, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p. 457 - 495, 1992.

FENTON, O.; Ó HUALLACHÁIN, D. Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. **Algal Research**, n.1, p. 49–56, 2012.

FIERRO, S.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; COPALCÚA, C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. **Bioresource Technology**, n.99, p.1274–1279, 2008.

FIORESI, T. B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. **Revista Biotemas**, v.21, n.1, 2008.

GARBAYO, I., VIGARA, A.J., CONCHON, V., MARTINS DOS SANTOS, V.A.P., VILCHEZ, C. Nitrate consumption alterations induced by alginate entrapment of *Chlamydomonas reinhardtii* cells. **Process Biochem.** 36, 459–466, 2000.

GERRARDI, M. H.; **Wastewater microbiology: nitrification/denitrification in the active sludge process**, 2. ed., Danvers-MA, Ed. Wiley-Interscience, 194p, 2002

GHIGGI, V. Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis*. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Curitiba, 2007.

GÖKSAN, T.; DUMAS, Y.; GOKPINAR, S. Effect of light paths lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetocerus muelleri* (Lemmermann, 1898). **Aquaculture**, n.217, p.431-436, 2003.

GOLDMAN, J. C.; GRAHAM, S. J. Inorganic Carbon Limitation and Chemical Composition of Two Freshwater Green Microalgae. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 60-70, 1981.

GOLDMAN, J. Outdoor algal mass cultures-I. Appl. **Water Res.** 13, 1–19, 1979.

GONZÁLEZ, L. E.; CAFIIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, n.60, p. 259-262, 1997.

GONZÁLEZ, C.; MARCINIAK, J.; VILLAVERDE, S.; GARCÍA-ENCINA, P. A.; MUÑOZ, R. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggyery wastewaters. **Appl Microbiol Biotechnol**, n.80, p. 891-898, 2008

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; RIAÑO-IRAZÁBAL, B.; MOLINUEVO-SALCES, B. BLANCO, S.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. **Appl Microbiol Biotechnol**, n.90, p.1147-1153, 2011.

GRIMA, E. Outdoor continuous culture *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. **Journal of Biotechnology**, n.70, p.271-288, 1999.

GRIS, L. S.; PAIM, A. C.; DOMENEGHINI, E. C.; BORGES, C. B.; TRIERWEILER, J. T.; FARENZENA, M. Produção de microalgas em reator *air lift*. **IX Oktoberfórum- Seminário do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, UFRGS**, 2010.

GROBBELAAR, J.U. Algal Nutrition Mineral Nutrition.In.: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing Ltd, 2004.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v.21, n. 5, p. 210-216, 2003.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow Green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUIMARÃES, P. S.; GIROLDO, D. Taxas de crescimento e de remoção de amônio dissolvido por duas microalgas verdes dulcícolas subtropicais: *Chlamydomonas* sp. (Chlamydonadales) e *Spondylosium pygmaeum* (Desmidiiales). **Anais IX Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço, MG, 2009.

HADDAD, P.R.(Coord.). O *cluster* suinícola do oeste de Santa Catarina. In: A competitividade do Agronegócio e o desenvolvimento regional no Brasil. Estudos de cluster. Brasília: CNPq/EMBRAPA, p.125- 180, 1999

HATA, J. Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 65-74, 2000.

HEREDIA- ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B.; Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 162, p.1978-1995, 2010.

HEALEY, F.P. Phosphate. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. **The biology of cyanobacteria.** (eds), Blackwell Scientific, Oxford, UK, 1982.

HOEK, V. D.; Mann, D. G.; Jahns, H. M. **Algae: an introduction to phycology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623p., 1997.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND (Ed), A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology.** London: Blackwell Science. p.312-351, 2004.

HYENSTRAND, P., BURKERT, U., PETTERSSON, A., BLOMQVIST, P. Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply. **Hydrobiologia**, n. 435, p. 91–98, 2000.

IBGE, Sistema de Recuperação Automática de Dados. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 10 de jun. de 2012.

IWAMOTO, H. Industrial production of microalgal cell- mass and secondary productions- Major industrial species: *Chlorella*. In: **Handbook of Microalgal culture. Biotechnol and Applied Phycology.** RICHMOND, A, Ed. Blacwell Published, Oxford, 255-263, 2004.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C.H.G.; FRANCO, T. T.Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nägeli* in tubular photobioreactors. **Chemical Engeering and Processing**, v. 47, n. 8, p. 1365- 1373, 2008.

JACOB LOPES, E. Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores. **Tese de Doutorado**, UNICAMPI, Campinas, 2007.

JAISWAL, P.; KASHYAP, A. Isolation and characterization of mutants of two diazotrophic cyanobacteria tolerant to high concentrations of inorganic carbon. **Microbiological Research**, n.157, p.83-91, 2002.

JOHN, E. H.; FLYNN, K. J. Modelling phosphate transport and assimilation in microalgae; how much complexity is warranted? **Ecological Modelling**, n.125, p. 145–157, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**, 8a ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

KAMATH, S. B.; CHIDAMBAR, S.; BRINDA, B.R.; KUMAR, M.A.; SARADA, R. pigment levels in cultured cells with special reference to green alga *Haematococcus pluvialis*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 768–773, 2005.

KANG, C. D.; AN, J. Y PARK, T. H.; SIM, S. J. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, n. 31, p. 234–238, 2006.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A.E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, A. Algal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed) **Handbook of Microalgal Mass Culture**, CRC Press, Boca Raton. p.98- 147, 1986.

KIM, M. K.; PARK, J. W.; PARK, C. S.; KIM, S. J.; JEUNE, K. H.; CHANG, M. U.; ACREMAN, J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, n.98, p.2220–2228, 2007.

KIM, J.; LINGARAJU, B. P.; RHEAUME, R.; LEE, J. Y.; SIDDIQUI, K. F. Removal of Ammonia from Wastewater Effluent by *Chlorella Vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 391- 396, 2010.

KITAYA, Y.; AZUMA, H.; KIYOTA, M. Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. **Advances in Space Research**, n.35, p.1584-1588, 2005.

Kolodny, n. h.; bauer, d.; Bryce, k.; Klucsevsek, k.; Lane, a.; ros, l. m.; Mercer, w.; Moin, s. Park, d.; Petersen, j.; Wright, j.; Yuen, c.; Wolfson, a.j.; Allen, m. m. Effect of Nitrogen Source on Cyanophycin Synthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6308. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n.3, p. 934–940, 2006.

KONG, Q. X.; LI, L.; MARTINEZ, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass

feedstock production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 9-18, 2010.

KRAPAC, I. G.; DEY, S. W.; ROY, W. R.; SMYTH, C. A.; STORMENT, E.; SARGENT, S. L.; STEELE, J. D.; Impacts of swine manure pits on groundwater quality. **Environmental Pollution**, n.120, p.475-492, 2002.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, n. 101 p.6012-6018, 2010.

KUHL, A. Phosphorus. In: Stewart, W. D. P. (ed.). **Algal Physiology and Biochemistry**. University of California Press, Los Angeles, USA, p. 636-654, 1974.

KUNZ, A.; HIGARASHI, M. M.; OLIVEIRA, P. A. Tecnologias de manejo e tratamento de dejetos de suínos estudadas no Brasil. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.22, n.3, p.651-665, 2005.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R.L.R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, n.100, p. 5485-5489, 2009.

LAVÍN, P. P.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in batch cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, n. 53, p. 55-68, 2005.

LAU, P.S.; TAM, N.F.Y.; WANG, Y.S. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. **Environ. Pollut**, n.89, p. 56-66, 1995.

LAVOIE, A.; DE LA NOÛE, J. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*. A new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Res.* 19, 1437-1442, 1985.

LEE, Y.K.; LOW, C.S. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, n.40, p.1119-1122, 1992.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synemathococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synemathococcus* sp. strain PCC 8807. **Bioresource Technology**, n.97, p.2427-2434, 2006.

LEE, K.; LEE, C.G. Effect of Light/dark Cycles on Wastewater Treatments by Microalgae. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** n. 6, p. 194-199, 2001.

LEE, R.E (Ed). **Phycology**. 4th ed. Cambridge University Press. Colorado State University, USA, 2008.

LEE, S. H.; SUN, N. K.; JANG, J. W.; AN, G. H.; WON, M.; SONG K. B. Characterization of *Phaffia rhodozyma* 3A 4-8. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 9, p. 258-261, 2004.

LI, Y.; CHEN, Y.; CHEN, P.; MIN, M.; ZHOU, W.; MARTINEZ, B.; ZHU, J.; RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, n. 102, p. 5138–5144, 2011.

LIMA, M. A.; LIGO, M. A. V.; CABRAL, M. R.; BOEIRA, R. C.; PESSOA, M. C. P. Y.; NEVES, M. C. Emissão de gases de efeito estufa provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil: **EMBRAPA Meio Ambiente**, Jaguariúna, 1999.

LINCOLIN, E.P.; EARLE, J.F.K. Wastewater treatment with microalgae. In: Akatsuka, I. (Ed.), **Introduction to Applied Phycology**. SPB Academic Publishing by The Hague, The Netherlands, p. 429–446, 1990.

LORENZEN, C. J. Determination of Chlorophyll and Pheo- Pigments: Spectrophotometric Equations. **Limnology and Oceanography**. v. 12, n. 2, p. 343- 346, 1967.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações**. Rima: São Carlos, 2006.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brok**. 10 ed. São Paulo; Prattice Hall Inc., 608p, 2004.

MANETTI, A. G. S. Avaliação do reuso da água residuária oriunda de uma indústria de processadora de pescado utilizando *Aphanothece microscópica Nægeli*. Dissertação de Mestrado, FURG, Rio Grande, RS, 2008.

MARIN, A. R.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; STEPHENSON, T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**. n.101, p. 58–64, 2010.

MARTIN, C.; DE LA NOÛE, J.; PICARD, G. Intensive culture of freshwater microalgae on aerated pig manure. **Biomass**, n.7, p. 245–259, 1985.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMENEZ, J. M.; YOUS, F. E.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, n.73, p. 263-272, 2000.

MASOJÍDECK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 20-39, 2004.

MACGINN, P. J.; DICKINSON, K. E.; PARK, K. C.; WHITNEY, C. G.; MACQUARRIE, S. P.; BLACK, F. J.; FRIGON, J. C.; GUIOT, S. R.; O'LEARY, S. J. B. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. **Algal Research**, article in press ALGAL-00013, 11 p., 2012.

MAC ALPINE, R.; SOULE, B. Quantitative Chemical Analysis, New York, p. 476- 575, 1933. In: **Spectrophotometer Handbook D/R 2010**, HACH., 2010.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M. C. HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, n.30, v.1, p.173-178, 2010.

MIELE, M. Contratos, especialização, escala de produção e potencial poluidor na suinocultura de Santa Catarina. **Tese Doutorado**. Porto Alegre: UFRGS, 286p 2006.

MIELE, M.; MACHADO, J. S. Panorama da carne suína brasileira. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 34-42, 2010.

SCHAUN, N. M. Difusão de tecnologia no Centro Nacional de Pesquisa de Milh

MIRANDA, C. R.; COLDEBELLA, A. **Aspectos produtivos e ambientais da suinocultura desenvolvida na sub-bacia do Lajeado Fragosos. Concórdia: EMBRAPA – CNPSA, 22p., 2002.**

MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; MIYACHI, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in chlorella cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 93, 625–634, 1964.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. **Journal of Biotechnology**, n.70, p.231-247, 1999.

MULKERRINS A, D; DOBSONA, A.D.W; COLLERANB, E. Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. **Environ. int.** n. 30, p. 249– 259, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; Lehninger Princípios de Bioquímica, 4a ed, Sarvier, São Paulo, 2006.

NOGUEIRA, C. C. P.; SILVA, I. J. O. Aplicação de águas residuárias da suinocultura na irrigação. **Thesis**, São Paulo, v.6, n.2, p.18-29, 2006.

OBAJA, D.; MAC, J.; COSTA, J.; SANS, C., MATA-ALVAREZ, J. Nitrification, denitrification and biological phosphorus removal in piggery wastewater using a sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, n.87, p. 103–111, 2003.

OHSE, S; DERNER, R. B; OZÓRIO, R. O; BRAGA, M.C; CUNHA, P; LAMARCA, C. P; SANTOS. M.E. Production of biomass and carbon, hydrogen, nitrogen and protein contents in microalgae. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.39, n.6, p.1760-1767, 2009.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 459-466, 2003.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PÉREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, n.15, p. 249–257, 2003.

OLSSON, L. e NILSEN, J., On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivation. **Tibtech**. Vol. 15, p.517-522, 1997.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M.; Borowitzka, L. **Micro-algal Biotechnology**. 2th Ed., Sydney, 477 pp., 1988.

OSWALD, W.J., GOTAAS, H.B. Photosynthesis in sewage treatment. **Trans. Am. Soc. Civil. Eng.**, n.122, 73–105, 1957.

PADISÁK, J. PHYTOPLANKTON in: REYNOLDS, C.S.; O'SULLIVAN, P.E. (eds.) **The Lakes Handbook**. Oxford Blackwell publishing, Oxford, p.251 – 298, 2004.

PARK, J. B. K. CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, n.102, p. 35–42, 2011.

PERIRA, L. S. F.; SENNA A. J. T.; KUNS, A. Análise do desempenho de um sistema de aeração por difusor poroso de bolha fina instalado no reator biológico aeróbio (rba) da estação de tratamento de dejetos suínos (etds) da Embrapa. **I Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, Bauru, SP, 2010.

PERFETO, P. N. M.; SCHWARZBOLD, A.; DILLENBURG, L. R. Efeitos da salinidade, temperatura e concentração de fósforo na composição química de *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux (Gelidiaceae, Rhodophyta). **Biotemas**, n. 18, v.1, p. 7 - 26, 2005.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella*

vulgaris immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Phycology**, n. 46, p. 800–812, 2010.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. **Bioresource Technology**, n.102, p. 17–25, 2011.

PRINS, H. B. A.; SNEL, J. F. H.; HELDER, R. J.; Photosynthetic HCO₃ – utilization and OH⁻ excretion in aquatic angiosperms. **Plant Physiology**, n. 66, p. 818-822, 1980.

POWELL, N.; SHILTON, A.; CHISTI, Y.; PRATT, S. Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. **Water research**, n.43, p. 4207–4213, 2009.

PRZYTOCKA-JUSIAK, M.; DUSZOTA, M.; MATUSIAK, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewaters. **Water Research**, v.18, n.1, p. 1-7, 1984.

PULZ, O.; SCHEINBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. **Advances Biochemical Engineering and Biotechnology**, n.59, p.123-152, 1998.

QUEIROZ, M. I. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nögeli* cultivated in heterotrophically fish processing wastewater. *Applied Energy*, v. 88, p. 3438- 3443, 2011.

QUEIROZ, M. I.; The *Aphanothece microscopica Nögeli* potencial in the production of the single- cell protein from the remainig water. In.: CHAMES, S. W. et al. (Eds.) **Proceddings of the eighth International Congress on Engeenering and Food**, Pennsylvania, USA, p. 1027-2031, 2001.

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7a. Ed. Coord.

RAWAT, I., R. KUMAR, T, R. MUTANDA; BUX, F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **App Energy**, v. 88, n. 10, p. 3411-3424, 2011.

REBOLLOSO FUENTES, M.M.; GÁRCIA SANCHEZ, J.L.; FERNANDEZ SEVILLA, J.M.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; SANCHEZ PEREZ, J.A.; MOLINA

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo. **Dissertação de Mestrado**, FURG, Rio Grande, 2003.

REVIERS, B. **Biologia e Filogenia das Algas**. Artmed, Porto Alegre, 280p., 2006

RICHIMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In.: ROUND, F. E.; CHAPMAN, D. J. (ED). **Progress in Phycological Research**. Biopress, Bristol, p. 269-330, 1990.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 566 p., 2004.

RODRIGUES, J. B. R. BELLI FILHO. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, n. 17, v.2, p.7 - 26, 2004.

RODRIGUES, J. B. R. Eficiência do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos da suinocultura: valorização e tratamento. **Tese de Doutorado**, UFSCar, São Carlos, SP, 2000.

SARAIVA, L. B. Remoção de nutrientes em efluente de industria de parboilização de arroz. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.

SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algal Biomass: production and use**. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p 852, 1980.

SHEN, Y.; WANG, J.; CHEN, W.; LIN, X. Reduction of nitrogen and phosphorus in piggery water with algal culture. **Advanced Materials Research**, v. 518-523, p. 2170- 2173, 2012.

SICKO-GOAD, L.; ANDRESEN, N.A. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. **J. Phycol**, n.27, p.710–718, 1991.

SILVA, F. Biorremediação de Nitrogênio, Fósforo e Metais Pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do Efluente Hidropônico, através do uso de *Chlorella vulgaris*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis- SC, 2006.

SINGH, L.; PAVANKUMAR, A.R.; LAKSHMANAN, R. Effective removal of Cu²⁺ ions from aqueous medium using alginate as biosorbent. **Ecol. Eng.**, n.38, 119–124, 2012.

STEIN, J.R. **Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements**. Cambridge University, 448p, 1973.

SOUTH, G.R.; HITTICK, A. **Introduction to Phycology**. Oxford: Blackwell Scientific, p. 341, 1987.

SOUZA, C. V. Análise ambiental e energética do tratamento de dejetos líquidos de suínos. **Dissertação de Mestrado** Universidade federal do Vale do Jequetinhonha e Macuri- UFVJM, Diamantina – MG, 2009.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Comercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, p. 87-96, 2006.

SRIRAM, S.; SEENIVASAN, R. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. **J. Algal Biomass Utln**, n. 3, v. 2, p 9- 13, 2012.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T, R. A practical handbook of seawater analysis . **Bull. Fish. Res. Bd. Can**, n.167, p. 1-311, 1968.

SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. **Bioresource Technology**, n. 118, p. 469–476, 2012.

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. **Current Science**, v.89, n.1, p.47-57, 2005.

TALBOT, P., DE LA NOÛE, J. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. **Water Res**, n.27, v.1, p.153–159, 1993.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. **Environ. Pollut.**, n.58, p.19–34, 1989.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.3-19, 2004.

TRAVIESO, L.; BENITEB, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; MARTIN, A.; CONSEJO, M.F.C. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. **Ecological engineering**, n.28, p.158–165, 2006.

VALIENTE, E.F.; LEGANES, F. Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in cyanobacterium *Nostoc UAM 205*. **J. Plant Physiol**, n.135, p.623-627, 1989.

VENKATARAMAN, L. V.; DEVI, K. M.; MAHADEVASWAMY, M.; MOHAMMED, A. A. Utilisation of rural wastes for algal biomass production with *scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* in India. **Agricultural Wastes**, n. 4, p. 117 -130, 1982.

VENDRUSCOLO, J. B. G. Cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluente de biodigestores de aves e suínos. **Dissertação Mestrado**. Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2009.

VOGEL. **Análise Química Quantitativa**. 6a ed. Rio de Janeiro, 462p., 2002.

WANG, B. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 707-718, 2008.

WANG, H.; XIONG, H.; HUI, Z.; ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, n.104, p. 215–220, 2012.

WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; RUAN, R. Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. **Appl Biochem Biotechnol**, n.162, p.1174–1186, 2010.

WU, Y. H.; YU, Y.; XIN, L.; HU, H. Y.; SU, Z. F. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. **Bioresource Technology**, n.112, p.193–198, 2012.

XIN, L.; YING, H. H.; KE, G.; JIA, Y. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources **Ecological Engineering**, n. 36, p.379–381, 2010.

XIN, L.; YING, H. H.; KE, G.; XUE, S. Y. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, n.101, p.5494–5500, 2010.

YAN, R. et al. Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 9, 2011.

YANG, S., WANG, J., CONG, W. Utilization of nitrite as nitrogen source by *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Letters**, n.26, p. 239–243, 2004.

ZHANG, Y.; NOORI, J.S.; ANGELIDAKI, I. Simultaneous organic carbon, nutrients removal and energy production in a photomicrobial fuel cell (PFC). **Energy Environ. Sci**, n. 4, p. 4340–4346, 2011.

ZDRADEK, C.P.; SCHMIDELL, W. e SOARES, H.M. Determinação da concentração de sólidos totais: comparação entre os resultados obtidos em estufa convencional e em forno microondas. **XI MET - Encontro Nacional de Metodologias de Laboratório, SC Brasil. Anais** p. 36, 2006.

9. ANEXOS

Anexo 1- Triplicata da análise de biomassa das microalgas avaliadas no experimento.

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>C. vulgaris</i>	9,5	12,1	13,2	14,5	14,0	14,0	14,0	13,6	15,0	15,5	16,0	17,0
<i>C. vulgaris</i>	9,9	12,1	13,3	14,2	13,8	10,8	13,5	13,8	14,5	15,1	15,7	16,9
<i>C. vulgaris</i>	9,8	12,0	13,0	14,1	14,3	13,7	13,2	14,0	14,8	15,5	15,8	16,1
<i>S. quadricauda</i>	9,5	12,0	13,9	13,7	16,6	13,9	14,0	13,9	15,1	16,1	17,0	18,5
<i>S. quadricauda</i>	9,3	12,1	13,8	13,9	14,5	13,7	13,8	14,0	14,5	15,4	17,1	18,6
<i>S. quadricauda</i>	9,5	12,4	14,1	14,0	14,2	14,0	13,5	13,6	15,0	15,0	17,5	18,9
<i>H. pluvialis</i>	10,6	13,3	13,6	13,9	13,3	15,4	15,8	16,1	16,5	16,4	19,5	21,0
<i>H. pluvialis</i>	10,3	12,7	13,4	14,5	13,4	14,8	15,7	15,8	16,0	16,5	19,6	20,8
<i>H. pluvialis</i>	10,1	13,0	13,3	13,7	12,8	15,0	15,9	15,9	16,0	16,7	19,7	20,0

Anexo2- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a biomassa das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no experimento com efluente sintético

Resultado ANOVA					
Fator de Variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	P
Intercept	5,909173	1	5,909173	154534,7	0,000000
"Var1"	0,008361	2	0,004181	109,300000	0,000323
Error	0,000153	4	0,000038		
R1	0,104057	10	0,010406	465,800000	0,000000
R1*"Var1"	0,010534	20	0,000527	23,600000	0,000000
Error	0,000894	40	0,000022		

Anexo 3- Triplicata da análise de fosfato referente ao experimento com efluente sintético (mg.L-1).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>C. vulgaris</i>	113,3	83,2	76,2	74,8	68,5	59,1	32,9	29,17	25,1	3,3	4,3	4,3
<i>C. vulgaris</i>	113,6	83,3	76,3	74,0	68,1	58,8	33,2	29,50	25,1	3,9	4,0	4,3
<i>C. vulgaris</i>	113,4	83,5	77,1	74,9	67,9	59,3	32,9	29,72	25,9	3,6	3,9	4,4
<i>S. quadricauda</i>	113,3	74,2	72,0	68,6	63,3	52,1	46,8	35,25	23,6	19,7	2,6	1,9
<i>S. quadricauda</i>	113,6	73,8	72,5	68,9	63,8	52,4	47,2	35,58	23,7	19,8	2,5	1,9
<i>S. quadricauda</i>	113,0	74,4	71,9	68,2	62,9	52,0	46,9	36,67	23,0	20,2	2,7	1,9
<i>H. pluviatis</i>	113,3	80,2	76,5	67,0	63,2	56,8	32,9	29,17	25,1	3,4	2,0	0,8
<i>H. pluviatis</i>	113,5	78,9	76,7	66,5	62,9	56,5	32,7	29,48	25,5	3,4	1,9	0,8
<i>H. pluviatis</i>	113,8	80,0	77,0	67,0	62,7	54,8	32,7	28,97	24,9	3,6	1,8	0,8

Anexo 4- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a remoção de fosfato das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no experimento com efluente sintético.

Resultado ANOVA					
Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	211,0163	1	211,0163	9094607	0,000000
"Var1"	0,5551	2	0,2775	11962	0,000000
Error	0,0001	6	0,0000		
R1	47,0531	12	3,9211	52810	0,000000
R1*"Var1"	2,5180	24	0,1049	1413	0,000000
Error	0,0053	72	0,0001		

Anexo 5- Triplicata da análise de amônio referente ao experimento com efluente sintético (mg.L⁻¹).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>C. vulgaris</i>	224,0	220,0	200,7	198,5	189,3	160,1	70,7	61,6	58,8	53,6	32,8	32,1
<i>C. vulgaris</i>	224,1	228,4	200,7	198,8	189,4	159,9	70,6	61,4	58,1	54,0	33,1	32,8
<i>C. vulgaris</i>	223,1	225,5	201,0	199,1	189,0	160,1	70,9	61,1	59,3	54,2	32,8	33,2
<i>S. quadricauda</i>	224,0	213,2	192,5	190,7	185,8	180,3	160,1	73,6	64,2	56,8	31,7	29,4
<i>S. quadricauda</i>	224,2	214,0	192,9	190,2	185,7	180,4	161,0	73,8	68,1	56,9	32,0	29,9
<i>S. quadricauda</i>	224,4	213,2	192,5	191,1	186,0	180,8	160,2	72,3	65,3	57,1	32,2	29,6
<i>H. pluviialis</i>	224,0	200,7	195,6	183,6	181,4	168,9	77,6	70,4	63,5	54,2	50,0	32,0
<i>H. pluviialis</i>	224,0	201,0	195,3	183,0	181,3	169,0	77,7	70,4	63,7	55,1	49,3	31,8
<i>H. pluviialis</i>	224,2	201,0	195,5	183,4	182,0	168,8	78,2	70,9	62,4	52,2	49,5	32,1

Anexo 6- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a remoção de amônio das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no experimento com efluente sintético

Resultado ANOVA					
Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	381,5545	1	381,5545	24471325,7	0,000000
"Var1"	0,0221	2	0,0111	709	0,000000
Error	0,0001	6	0,0000		
R1	10,4463	10	1,0446	103411	0,000000
R1*"Var1"	0,2995	20	0,0150	1483	0,000000
Error	0,0006	60	0,0000		

Anexo 7- Triplicata da análise de clorofila *a* referente ao experimento com efluente sintético (mg.L⁻¹).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>C. vulgaris</i>	0,03	0,00	0,08	0,08	0,06	0,06	0,06	0,06	0,30	0,33	0,42	0,19
<i>C. vulgaris</i>	0,03	0,08	0,03	0,08	0,08	0,22	0,19	0,03	0,14	0,19	0,06	0,33
<i>C. vulgaris</i>	0,03	0,03	0,06	0,03	0,08	0,00	0,06	0,33	0,03	0,00	0,06	0,06
<i>S. quadricauda</i>	0,08	0,06	0,06	0,06	0,03	0,08	0,00	0,03	0,06	0,22	0,25	0,03
<i>S. quadricauda</i>	0,00	0,03	0,03	0,03	0,06	0,03	0,14	0,06	0,03	0,03	0,11	0,25
<i>S. quadricauda</i>	0,00	0,03	0,06	0,06	0,08	0,08	0,06	0,14	0,19	0,08	0,00	0,11
<i>H. pluvisalis</i>	0,03	0,03	0,00	0,08	0,03	0,03	0,00	0,03	0,03	0,11	0,11	0,11
<i>H. pluvisalis</i>	0,03	0,06	0,06	0,03	0,08	0,06	0,06	0,03	0,14	0,03	0,08	0,08
<i>H. pluvisalis</i>	0,00	0,00	0,03	0,00	0,06	0,08	0,11	0,11	0,06	0,08	0,03	0,11

Anexo 8- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de clorofila *a* das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* no experimento com efluente sintético

Resultado ANOVA					
Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	3459,739	1	3459,739	1412,882	0,000000
"Var1"	6,057	2	3,028	1,237	0,366117
Error	12,244	5	2,449		
R1	401,981	11	36,544	15,593	0,000000
R1*"Var1"	40,609	22	1,846	0,788	0,726265
Error	128,898	55	2,344		

Anexo 9- Triplicata da análise de biomassa das microalgas avaliadas no experimento com efluente real (mg.L^{-1}).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	5,5	0	2,5	21,0	40	35	34,5	61,5	60,5	59	52	61	66,5	68
<i>C. vulgaris</i>	5,5	0	2,5	14,0	28,5	31	20,5	61,5	47,5	44	38,5	61	66,5	68
<i>C. vulgaris</i>	6,5	0	3,5	15,0	30,5	35,5	21,5	36	46,5	49,5	55	61	66,5	68
<i>S. quadricucuda</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. quadricucuda</i>	0,5	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. quadricucuda</i>	0,5	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. pluviatis</i>	15	15,5	28,5	30,5	41,5	41,5	47,5	25,5	51,5	63,5	69,5	84,5	90,5	93
<i>H. pluviatis</i>	17,5	18,5	16	35,5	30,5	30,5	41,5	20,5	41,5	69,5	77,5	69,5	76	93,5
<i>H. pluviatis</i>	17,5	4,5	29,5	20	43	43	54,5	25,5	50	67,5	73,5	84	91	90

Anexo 10- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de biomassa das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	72,65136	1	72,65136	28415,41	0,000000
"Var1"	5,53076	2	2,76538	1081,60	0,000003
Error	0,01023	4	0,00256		
R1	1,60450	13	0,12342	67,37	0,000000
R1*"Var1"	1,27157	26	0,04891	26,70	0,000000
Error	0,09526	52	0,00183		

Anexo 11- Triplicata da análise de amônio no experimento com efluente real (mg.L⁻¹).

Tratamento	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	41,2	37,8	28,8	18,3	16,7	20,2	15,5	16,2	12,9	13,4	10,9	7,6	8,0	3,0
<i>C. vulgaris</i>	40,3	42,6	30,5	20,3	20,6	18,1	15,5	14,7	13,9	12,9	11,1	7,6	8,0	3,0
<i>C. vulgaris</i>	42,5	40,3	30,5	24,1	20,6	16,9	17,4	13,6	13,6	14,7	11,8	7,6	8,0	3,0
<i>S. quadriacuda</i>	43,1	37,0	36,3	36,2	34,3	34,8	35,0	35,9	36,5	33,6	33,2	32,1	29,8	32,1
<i>S. quadriacuda</i>	44,7	35,9	35,2	34,6	30,0	34,8	30,3	37,9	37,6	36,1	34,3	34,8	34,3	32,7
<i>S. quadriacuda</i>	42,8	33,8	32,8	33,6	31,5	35,8	36,5	34,5	37,6	35,4	37,0	32,3	30,3	30,9
<i>H. pluvialis</i>	36,9	39,9	29,8	26,5	21,9	23,0	22,4	9,5	8,8	9,9	8,2	5,4	2,4	1,3
<i>H. pluvialis</i>	38,3	39,9	28,3	23,8	23,0	23,4	22,3	9,4	11,6	9,2	7,2	5,3	2,8	1,3
<i>H. pluvialis</i>	40,8	38,7	27,8	23,8	23,2	23,4	21,1	10,9	9,1	9,2	7,9	4,4	1,5	1,1

Anexo 12- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statística 7.0 para a remoção de amônio das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	27424,73	1	27424,73	4842,566	0,009148
Trat	1587,23	2	793,62	140,134	0,059627
Error	5,66	1	5,66		
R1	2214,78	10	221,48	108,390	0,000000
R1*trat	855,93	20	42,80	20,944	0,000012
Error	20,43	10	2,04		

Anexo 13. Triplicata da análise de nitrato no experimento com efluente real (mg.L^{-1}).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	9,0	9,2	7,4	5,0	5,9	4,91	4,9	2,8	4,5	4,2	3,9	2,9	2,8	2,2
<i>C. vulgaris</i>	9,9	9,2	7,3	5,9	4,7	4,15	4,9	4,3	4,2	2,6	3,6	2,9	2,8	2,2
<i>C. vulgaris</i>	8,0	10,4	7,6	7,0	5,1	3,99	4,8	4,4	4,1	3,9	4,9	2,9	2,8	2,2
<i>S. quadricauda</i>	9,2	7,6	8,9	9,5	10,0	9,27	9,0	9,0	9,7	10,5	9,2	8,8	9,0	10,0
<i>S. quadricauda</i>	10,0	11,6	8,9	9,8	8,4	8,75	9,7	7,9	9,9	10,5	9,0	9,9	9,9	10,0
<i>S. quadricauda</i>	9,5	9,6	9,8	9,3	9,7	8,23	10,5	10,0	9,0	8,9	11,8	9,8	10,4	9,8
<i>H. pluvialis</i>	8,8	9,2	8,6	5,0	4,6	4,88	4,6	4,9	4,2	4,9	4,8	2,6	1,5	1,8
<i>H. pluvialis</i>	9,2	10,0	9,2	4,6	4,0	4,76	5,3	4,6	4,4	4,5	4,6	1,8	1,6	1,1
<i>H. pluvialis</i>	9,5	12,8	8,2	5,9	4,6	5,95	4,2	7,4	4,4	4,3	5,5	1,4	1,8	2,0

Anexo 14- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a remoção de nitrato das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	2153,028	1	2153,028	1158,321	0,000862
Trat	126,321	2	63,161	33,980	0,028588
Error	3,717	2	1,859		
R1	87,517	10	8,752	14,398	0,000000
R1*trat	53,678	20	2,684	4,415	0,000825
Error	12,157	20	0,608		

Anexo 15- Triplicata da análise de nitrito no experimento com efluente real (mg.L⁻¹).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	101,9	103,7	108,9	109,1	103,5	106,0	103,6	100,0	98,0	99,6	85,0	83,3	77,6	70,2
<i>C. vulgaris</i>	101,6	102,4	106,9	107,5	100,4	105,9	103,6	101,3	99,3	97,9	85,6	83,3	77,6	70,2
<i>C. vulgaris</i>	102,9	102,4	107,8	107,2	102,1	105,6	104,0	101,8	98,7	93,6	80,2	83,3	77,6	70,2
<i>S. quadriacuda</i>	105,5	104,5	102,2	102,8	103,5	102,1	102,8	103,9	104,4	102,7	80,2	102,2	102,9	103,6
<i>S. quadriacuda</i>	104,8	104,0	103,4	102,1	102,1	101,2	102,8	103,6	104,0	103,7	103,4	104,0	102,7	103,5
<i>S. quadriacuda</i>	105,5	104,0	102,7	101,8	102,1	102,5	102,3	103,3	103,5	103,3	102,8	103,5	102,7	103,0
<i>H. pluviatis</i>	100,4	107,2	104,2	102,4	101,4	102,1	100,8	92,1	93,6	93,6	92,7	94,7	96,1	97,0
<i>H. pluviatis</i>	106,5	105,5	105,6	105,5	102,1	103,9	101,8	93,6	97,4	93,6	94,9	93,6	95,3	96,2
<i>H. pluviatis</i>	110,6	105,1	105,0	104,4	103,9	103,9	100,8	96,7	95,3	95,0	93,8	94,9	55,0	97,8

Anexo 16- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a remoção de nitrito das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	421458,0	1	421458,0	245908,3	0,000004
"Var1"	90,4	2	45,2	26,4	0,036517
Error	3,4	2	1,7		
R1	256,1	8	32,0	43,1	0,000000
R1*"Var1"	265,4	16	16,6	22,3	0,000000
Error	11,9	16	0,7		

Anexo 17- Triplicata da análise de fosfato referente ao experimento com efluente real
(mg.L⁻¹)

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	2,5	3,1	3,3	2,5	0,9	0,8	0,9	0,1	0,5	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0
<i>C. vulgaris</i>	3,1	1,8	1,6	1,6	1,0	0,6	0,8	0,3	0,9	0,1	1,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. vulgaris</i>	3,0	1,8	2,0	1,6	1,0	0,8	0,8	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00
<i>S. quadricauda</i>	3,0	1,6	2,5	2,0	2,2	3,4	2,2	3,0	2,4	2,3	2,5	2,2	2,3	2,6
<i>S. quadricauda</i>	2,2	1,2	2,1	2,4	2,3	1,6	2,1	3,0	2,3	1,5	2,1	2,5	2,1	2,6
<i>S. quadricauda</i>	2,5	3,3	2,1	2,7	2,3	2,0	2,1	2,2	2,0	2,9	2,0	2,5	2,1	2,5
<i>H. pluviatis</i>	2,9	2,5	1,9	1,1	1,8	0,9	0,2	0,2	0,2	2,9	0,1	0,0	0,0	0,0
<i>H. pluviatis</i>	2,7	2,2	1,5	1,4	1,9	0,7	0,4	0,3	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
<i>H. pluviatis</i>	3,0	2,6	1,8	1,5	1,6	0,8	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0

Anexo 18- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a remoção de fosfato das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	131,2075	1	131,2075	401,1767	0,000272
"Var1"	13,5511	2	6,7756	20,7168	0,017543
Error	0,9812	3	0,3271		
R1	17,5000	9	1,9444	14,0076	0,000000
R1*"Var1"	12,7576	18	0,7088	5,1058	0,000079
Error	3,7480	27	0,1388		

Anexo 19- Triplicata da análise de clorofila *a* referente ao experimento com efluente real (mg.L⁻¹).

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C. vulgaris</i>	0,0	0,1	0,1	0,5	1,0	0,9	0,1	0,7	0,6	0,5	0,6	2,2	0,0	0,0
<i>C. vulgaris</i>	0,0	0,0	0,6	0,9	0,6	0,4	0,1	1,5	0,0	0,7	1,9	0,0	0,0	0,0
<i>C. vulgaris</i>	0,0	0,1	0,5	0,2	0,1	0,2	1,1	0,5	1,1	1,5	0,8	0,2	1,4	1,4
<i>S. quadricauda</i>	0,4	0,4	0,5	0,0	0,8	0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4	0,7
<i>S. quadricauda</i>	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,1	0,1	0,5	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
<i>S. quadricauda</i>	0,0	0,3	0,6	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1
<i>H. pluviatis</i>	0,1	0,1	0,5	1,2	0,9	1,6	1,3	0,0	0,5	1,5	3,0	2,7	1,9	1,9
<i>H. pluviatis</i>	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	1,6	0,7	0,6	1,2	0,9	1,0	2,2	1,6
<i>H. pluviatis</i>	0,1	0,4	0,1	0,2	0,9	0,4	0,2	1,3	2,1	0,8	0,9	1,8	2,1	3,8

Anexo20- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statistica 7.0 para a concentração de clorofila *a* das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	53,52550	1	53,52550	6834,355	0,000004
"Var1"	3,13672	2	1,56836	200,254	0,000641
Error	0,02350	3	0,00783		
R1	2,10241	6	0,35040	28,212	0,000000
R1*"Var1"	2,03495	12	0,16958	13,653	0,000001
Error	0,22356	18	0,01242		

Anexo 21- Triplicata da análise de carotenóides referente ao experimento com efluente real ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

Tempo (Dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>C.vulgaris</i>	0,3	0,5	0,7	1,2	0,9	1,8	0,9	0,6	0,4	0,2	0,4	1,5	1,5	1,8
<i>C.vulgaris</i>	0,3	0,5	0,8	0,9	1,4	1,5	1,1	1,5	0,3	0,3	0,8	1,5	1,5	1,8
<i>C.vulgaris</i>	0,4	0,5	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	0,9	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5	1,8
<i>S. quadriacuda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
<i>S. quadriacuda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>S. quadriacuda</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>H. pluvialis</i>	0,3	0,3	0,6	0,0	0,8	0,8	1,0	0,1	0,7	1,6	0,9	1,3	1,6	1,3
<i>H. pluvialis</i>	0,3	0,4	0,5	0,4	0,9	0,9	1,0	0,1	0,7	1,9	1,5	1,3	1,4	1,4
<i>H. pluvialis</i>	0,2	0,4	0,6	0,6	0,8	0,9	1,0	0,5	0,7	1,4	1,9	1,5	1,4	1,6

Anexo 22- Resultado da análise de variância (ANOVA) obtida pelo programa Statística 7.0 para a concentração de carotenóides das microalgas *C. vulgaris*, *S. quadricauda* e *H. pluvialis* em função do tempo no experimento com efluente real.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Intercept	12,59878	1	12,59878	74,75747	0,013114
"Var1"	4,61724	2	2,30862	13,69868	0,068033
Error	0,33706	2	0,16853		
R1	1,92715	6	0,32119	4,51632	0,012744
R1*"Var1"	2,13941	12	0,17828	2,50687	0,062589
Error	0,85342	12	0,07112		

Anexo 23- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a concentração de biomassa (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo com efluente sintético. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	9,70 a	9,40 a	10,30 a
1	12,05 a	12,15 a	12,95 a
2	13,15 a	13,85 a	13,40 a
3	14,25 a	13,85 a	14,00 a
4	13,95 a	15,05 a	13,15 a
5	12,75 a	13,80 a	15,05 a
6	13,50 a	13,70 a	15,80 a
7	13,75 a	13,80 a	15,90 a
8	14,75 a	14,80 a	16,15 a
9	15,35 a	15,45 a	16,60 a
10	15,80 a	17,20 a	19,60 a
11	16,60 a	18,60 a	20,55 a

Anexo 24- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a concentração de clorofila a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) das microalgas diariamente ao longo do cultivo com efluente sintético. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	0,03 a	0,03 a	0,02 a
1	0,04 a	0,04 a	0,03 a
2	0,06 a	0,05 a	0,03 a
3	0,06 a	0,05 a	0,04 a
4	0,07 a	0,06 a	0,06 a
5	0,09 a	0,06 a	0,06 a
6	0,10 a	0,06 a	0,06 a
7	0,14 a	0,07 a	0,06 a
8	0,16 a	0,09 a	0,07 a
9	0,18 a	0,11 a	0,07 a
10	0,18 a	0,12 a	0,07 a
11	0,19 a	0,12 a	0,10 a

Anexo 25- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de amônio (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo com efluente sintético. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	223,7 a	224,2 a	224,2 a
1	224,6 a	213,5 b	201,0 c
2	200,8 a	192,6 b	195,5 c
3	198,8 a	190,7 b	183,4 c
4	189,2 a	185,9 b	181,9 c
5	160,0 a	180,5 b	168,8 c
6	70,8 a	160,4 b	78,2 c
7	61,3 a	73,2 b	70,9 c
8	58,6 a	65,9 b	62,4 c
9	53,9 a	56,9 b	52,2 c
10	32,9 a	31,4 b	49,5 c
11	32,7 a	29,6 b	32,0 c
12	32,1 a	29,3 b	31,9 c

Anexo 26- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de fosfato (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo com efluente sintético. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	113,4 a	113,3 a	113,5 a
1	83,4 a	74,1 b	79,7 c
2	76,5 a	72,1 b	76,7 c
3	74,4 a	68,6 b	66,8 c
4	68,2 a	63,3 b	62,9 c
5	59,1 a	52,2 b	56,0 a
6	32,9 a	47,0 b	32,8 c
7	29,5 a	35,8 b	29,2 c
8	25,3 a	23,4 b	25,1 a
9	3,5 a	19,9 b	3,5 c
10	4,1 a	2,6 b	1,9 c
11	4,3 a	1,9 b	0,8 c
12	4,4 a	1,9 b	0,8 c

Anexo 27- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a concentração de biomassa das microalgas diariamente ao longo do cultivo em efluente real. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluviialis</i>
0	6,00 a	0,50 a	16,00 b
1	0,00 b	0,00 a	13,00 b
2	3,00 b	0,00 a	24,50 b
3	16,50 b	0,00 a	28,50 b
4	32,50 b	0,00 a	38,50 b
5	34,00 b	0,00 a	38,50 b
6	25,00 b	0,00 a	47,50 b
7	49,00 b	0,00 a	24,00 b
8	51,50 b	0,00 a	47,50 b
9	51,00 b	0,00 a	66,50 b
10	48,75 b	0,00 a	73,50 b
11	61,00 b	0,00 a	79,00 b
12	66,50 b	0,00 a	86,00 b
13	68,00 b	0,00 a	92,00 b

Anexo 28- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a concentração de clorofila *a* das microalgas diariamente ao longo do cultivo com efluente real. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluviialis</i>
0	0,03 a	0,17 a	0,12 a
1	0,08 a	0,31 a	0,29 a
2	0,38 b	0,41 a	0,25 ab
3	0,51 b	0,19 a	0,64 ab
4	0,54 b	0,44 a	0,71 b
5	0,52 b	0,09 a	0,75 b
6	0,42 b	0,04 a	1,02 b
7	0,91 b	0,11 a	1,04 b
8	0,86 b	0,28 a	1,04 b
9	0,89 b	0,15 a	1,16 b
10	1,12 b	0,17 a	1,59 c
11	1,20 b	0,31 a	1,83 b
12	1,36 b	0,30 a	2,09 b
13	1,41 b	0,23 a	2,43 b

Anexo 29- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a concentração de carotenóides das microalgas diariamente ao longo do cultivo. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	0,34 a	0,02 a	0,26 a
1	0,46 a	0,03 a	0,38 a
2	0,74 a	0,02 a	0,60 a
3	0,97 a	0,02 a	0,51 a
4	1,06 a	0,03 a	0,89 a
5	1,46 a	0,04 a	0,89 a
6	1,06 a	0,03 a	1,00 a
7	0,90 a	0,02 a	1,55 a
8	1,37 a	0,03 a	1,73 a
9	1,37 ab	0,03 a	1,63 b
10	1,82 ab	0,02 a	1,54 b
11	1,47 ab	0,04 a	1,35 b
12	1,54 ab	0,04 a	1,40 b
13	1,81 ab	0,04 a	1,41 b

Anexo 30- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de amônio (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	41,37 a	43,52 a	38,66 a
1	40,24 a	35,55 a	39,30 a
2	29,68 a	34,83 a	28,66 a
3	20,86 b	34,79 a	25,16 b
4	18,64 b	31,94 a	22,71 b
5	18,39 b	35,41 a	23,18 b
6	16,42 b	33,94 a	21,92 b
7	14,83 b	36,09 a	9,92 b
8	13,50 b	37,10 a	9,71 b
9	13,68 b	35,06 a	9,55 b
10	11,28 b	34,83 a	7,78 b
11	7,63 b	33,0 a	5,08 b
12	8,01 b	31,49 a	2,24 b
13	3,00 b	31,92 a	1,24 b

Anexo 31- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de nitrato (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	8,98 a	9,58 a	9,21 a
1	9,62 a	9,63 a	10,64 a
2	7,43 a	9,36 a	8,65 a
3	5,97 a	9,53 a	5,17 a
4	5,25 ab	9,36 a	4,43 b
5	4,35 b	9,00 a	5,20 ab
6	4,90 b	9,83 a	4,70 b
7	3,85 b	8,96 a	5,64 b
8	4,31 b	9,54 a	4,31 b
9	3,57 b	9,72 a	4,56 b
10	4,02 b	10,00 a	4,96 b
11	2,89 b	9,47 a	1,93 b
12	2,85 b	9,76 a	1,63 b
13	2,21 b	9,89 a	1,62 b

Anexo 32- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de nitrito (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluvialis</i>
0	102,16 a	105,29 a	105,86 a
1	103,04 a	104,16 a	105,95 a
2	107,90 a	102,77 a	104,95 ab
3	107,93 b	102,25 a	104,10 ab
4	102,01 a	102,82 a	102,49 a
5	105,85 a	101,95 a	103,02 a
6	103,78 a	102,57 a	101,15 a
7	101,04 a	103,58 a	94,14 b
8	98,66 b	103,96 a	95,42 b
9	97,02 b	103,22 a	94,28 b
10	83,57 c	103,10 a	93,81 b
11	83,33 c	103,24 a	94,38 b
12	77,64 c	102,81 a	82,14 b
13	70,24 c	103,33 a	96,99 b

Anexo 33- Resultado da análise estatística do teste de Tukey, realizada para comparar a remoção de fosfato (mg.L^{-1}) das microalgas diariamente ao longo do cultivo. Letras iguais indicam $p > 0,05$ e letras diferentes indicam $p < 0,05$.

Tempo (Dias)	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. quadricauda</i>	<i>H. pluviialis</i>
0	2,85 a	2,59 a	2,88 a
1	2,25 a	2,05 a	2,42 a
2	2,30 a	2,29 a	1,76 a
3	1,92 a	2,36 a	1,33 a
4	0,96 a	2,25 a	1,77 a
5	0,76 a	2,35 a	0,82 a
6	0,89 a	2,14 a	0,30 a
7	0,22 b	2,59 a	0,25 b
8	0,47 ab	2,24 a	0,24 b
9	0,14 b	2,20 a	0,13 b
10	0,56 ab	2,19 a	0,16 b
11	0,00 b	2,40 a	0,00 b
12	0,00 b	2,17 a	0,00 b
13	0,00 b	2,56 a	0,00 b