

Trabalho de Conclusão de Curso

Cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo

Mônica Jeremias Lúcio

Orientador: Dr. Roberto Bianchini Derner

2013/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL

MÔNICA JEREMIAS LÚCIO

**CULTIVO DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* COM EFLUENTE
DOMÉSTICO COMO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO**

Trabalho apresentado à Banca
Examinadora como parte dos
requisitos para Conclusão do Curso de
Graduação em Engenharia Sanitária e
Ambiental – TCC II

Orientador: Professor Dr. Roberto Bianchini Derner

Florianópolis
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL

MÔNICA JEREMIAS LÚCIO

CULTIVO DE MICROALGAS *Chlorella vulgaris* COM EFLUENTE DOMÉSTICO COMO MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO

Trabalho submetido à Banca Examinadora como parte dos requisitos para Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental–TCC II

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Roberto Bianchini Derner
(Orientador).



Prof. Dr. Fernando Soares Santanna
(Membro da Banca)



Rafael Garcia Lopes
(Membro da Banca)

FLORIANÓPOLIS, (SC)
MARÇO/2014

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isto não tem muita importância. O que interessa mesmo não é à noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

William Shakespeare

AGRADECIMENTO

Agradeço ao amor, sentimento que induz a proteger, cuidar, dedicar-se, criar grandes laços, boas sintonias, bons momentos; encontrado durante essa jornada por todos que encontrei no caminho.

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

Aos meus pais, Sarita e Lúcio que transbordaram amor para que esse sonho pudesse ser realizado. E acreditem em mim até quando eu não acreditei.

À minha irmã, Ana Flávia que mesmo longe sempre esteve presente com muita paciência até nas pequenas situações cotidianas.

Aos amigos que de algum modo se fizeram presentes deixando a caminhada mais leve e contente.

Ao LCA, que se tornou casa, mãe, família. Proporcionou estrutura para que o trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu orientador Dr. Roberto Bianchi Derner por ter tido paciência e bondade ao me ensinar.

A UFSC e professores por serem acolhedores, compreensivos.

RESUMO

O lançamento de esgoto em corpos d'água mesmo tratado pode resultar na poluição destes com uma carga rica em nutrientes fosfatados e nitrogenados, que acarreta eutrofização, entre outros problemas. As microalgas, micro-organismos fotossintetizantes, têm potencial para remover compostos inorgânicos das águas residuais e para produzir uma biomassa útil para a produção de biocombustíveis, fertilizantes e de outros bioprodutos. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o cultivo de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio alternativo. O efluente doméstico foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto Lagoa da Conceição da CASAN, no município de Florianópolis, Santa Catarina. O procedimento metodológico dividiu-se em três etapas: isolamento da *Chlorella vulgaris*, teste com três espécies de microalgas (*Desmodesmus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorococcales*) cultivadas no efluente doméstico tratado como meio de cultura alternativo, e o experimento principal, no qual foi comparando o cultivo em meio de cultura sintético WC com o meio de cultura alternativo (efluente). Cada etapa durou em torno de 14 dias, com monitoramento do pH, turbidez e da biomassa de microalgas. No experimento principal também foi avaliada a remoção de nutrientes nitrogenados e fosfatados. Verificou-se que *Chlorella vulgaris* alcançou, na etapa 2, uma biomassa de 1,701 g/L, produtividade de 0,118 g/L/d, velocidade de crescimento de 0,369 divisões por dia, densidade celular de 5.200×10^4 células/ml.

Palavras-chave: Microalgas, efluente doméstico, *Chlorella vulgaris*, biomassa, biotecnologia.

ABSTRACT

The discharge of sewage, whether treated in water bodies can result in the pollution of these with a rich cargo in phosphate and nitrogen nutrients, which causes eutrophication, among other problems. Microalgae, photosynthetic microorganisms have the potential to remove inorganic compounds from wastewater and to produce a useful tool for the production of biofuels, fertilizers and other biomass byproducts. Within this context, the present study was to evaluate the cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* with wastewater as an alternative mean. The wastewater was collected in Sewage Treatment Lagoa da Conceição CASAN Station, in Florianópolis, Santa Catarina. The methodological procedure was divided into three stages: isolation of *Chlorella vulgaris*, test with three species of microalgae (*Desmodesmus* sp. , *C. vulgaris* and *Chlorococcales*) grown in treated wastewater as alternative culture medium, and the main experiment, which was growing the *C. vulgaris* culture in wastewater as an alternative to the synthetic culture medium (WC) . Each step lasted around 14 days with the monitoring of pH, turbidity and microalgae biomass. In the main experiment the removal of nitrogenous and phosphorus nutrients were also assessed. It was found that *Chlorella vulgaris* reached, in step 2, a biomass of 1,701 g/L, productivity of 0.118 g/L/d, the growth rate of 0.369 divisions per day cell density of $5,200 \times 10^4$ cells / ml.

Keywords: Microalgae, wastewater, *Chlorella vulgaris*, biomass, biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Chlorella vulgaris</i>	23
Figura 2 - Cultivos em escala laboratorial.....	25
Figura 3 - Tanque aberto.....	27
Figura 4 - Fotobioreator.....	28
Figura 5 - Localização do LCA e ETE.....	43
Figura 6 - Isolamento da <i>Chlorella Vulgaris</i>	44
Figura 7 - Escolha da microalga para o experimento.....	45
Figura 8 - Experimento principal.....	46
Figura 9 - pH das culturas ao longo do cultivo.....	52
Figura 10 - Biomassa de microalgas ao longo do cultivo.....	53
Figura 11 - Densidade celular na escolha da microalga.....	54
Figura 12 - Densidade celular experimento principal.....	54
Figura 13 - Biomassa experimento principal.....	55
Figura 14 - Concentração inicial e final de ortofosfato nos meios de cultura.	56
Figura 15 - Concentração inicial e final de amônia nos meios de cultura.....	56
Figura 16 - Concentração inicial e final de Nitrato nos meios de cultura.....	56
Figura 17 - Concentração inicial e final de nitrito nos meios de cultura.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades dos principais grupos de algas	22
Tabela 2 - Comparação dos métodos de cultivo	28
Tabela 3 - Espécies de microalgas e seus métodos de cultivo	29
Tabela 4 - Microalgas contribuem para degradação de poluentes ambientais	38
Tabela 5 - Distribuição relativa das formas de nitrogênio segundo distintas condições	41
Tabela 6- Parâmetros do efluente	46
Tabela 7 - Composição do meio de cultura w.c.....	47
Tabela 8 - Parâmetros e métodos utilizados para análise dos cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i>	50
Tabela 9 - Velocidades de crescimento (K) e produtividade (P).....	52
Tabela 10 - Velocidades de crescimento (K) e produtividade (P) experimento principal.....	54
Tabela 11 – Velocidade de consumo do substrato.....	57

LISTA DE NOMENCLATURA E SIMBOLOGIA

μm - Micrômetro

ATP - Trifosfato de adenosina

DHA - Ácido docosa-hexaenóico

EPA - Ácido eicosapentaenóico

m – Massa inicial do filtro (g);

m0 – Massa final (g);

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

N-NH₄ - Concentração de nitrogênio amoniacal (mgN-NH₄+L-1);

N-NO₂⁻ - Concentração de nitrogênio na forma de nitrito (mgN-NO₂-L-1);

N-NO₃⁻ - Concentração de nitrogênio na forma de nitrato (mgN-NO₃-L-1);

P - Produtividade (mg.L-1. d-1);

P-PO₃⁻⁴ - Concentração de fósforo na forma de fosfato (mg P-PO₄L-1);

PUFA - Poly Insaturated Fatty Acid

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina;

UV – Radiação ultravioleta

W.C. - Water Culture

X – Biomassa final (mgL-1);

X – Concentração celular (mgL-1);

Xo – Biomassa inicial (mgL-1);

SUMÁRIO

1	Introdução.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	MICROALGAS.....	18
3.1.1	CHLORELLA VULGARIS.....	19
3.1.2	CULTIVOS DE MICROALGAS.....	20
3.1.3	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	26
3.1.4	MEIOS DE CULTIVO.....	29
3.2	BIOMASSA E SUAS APLICAÇÕES.....	30
3.2.1	BIODIESEL.....	30
3.2.2	BIOETANOL.....	31
3.2.3	BIO-HIDROGÊNIO.....	31
3.2.4	ÓLEOS E OMEGA 3.....	31
3.2.5	PIGMENTOS.....	32
3.2.6	NUTRIÇÃO HUMANA.....	32
3.2.7	ALIMENTO ANIMAL.....	32
3.2.8	OUTRAS APLICAÇÕES.....	33
3.3	POLIMENTO DE EFLUENTE COM MICROALGAS.....	33
3.3.1	EFLUENTE DOMÉSTICO.....	35
3.3.2	EUTROFIZAÇÃO.....	36
3.3.3	NITROGÊNIO E FÓSFORO NO EFLUENTE DOMÉSTICO.....	37
4	Metodologia.....	38
4.1	LABORATÓRIO DE CULTIVO DE ALGAS (LCA).....	38
4.2	ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO SANITÁRIO (ETE) – CASAN.....	38
4.3	ISOLAMENTO DA <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	40
4.4	ESCOLHA DA MICROALGA.....	40
4.5	EXPERIMENTO.....	41
4.5.1	CARACTERÍSTICAS DOS MEIOS.....	42
4.5.2	COLETA DO EFLUENTE.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.5.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO.....	44
4.5.4	CÁLCULOS REALIZADOS.....	44

4.5.5	DETERMINAÇÃO DE NUTRIENTES	45
5	Resultados e discussões	46
5.1	ESCOLHA DA MICROALGA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.2	EXPERIMENTO	48
6	Conclusão	52
7	Referências bibliográficas.....	53
8	Anexo.....	62

1 INTRODUÇÃO

A atividade que mais conduz a problemas relacionados à qualidade da água é o despejo de esgotos domésticos. As populações crescentes são responsáveis por essa atividade, especialmente quando concentrados em áreas urbanas, tendem a criar maiores volumes de resíduos domésticos e de esgoto, sobrecarregando rios e sistemas de tratamento, o que resulta em águas cada vez mais poluídas. Estima-se que 42% da água utilizada para finalidades domésticas e municipais acabam retornando ao ciclo da água, volume este que corresponde a 11% do total dos efluentes (ANA, 2011).

O lançamento de esgoto, mesmo tratado, em corpos d'água pode resultar na poluição destes últimos, que podem conter uma carga rica em nutrientes fosfatados e nitrogenados, que acarreta eutrofização, entre outros problemas (VON SPELING, 1995).

“Com esse cenário o reuso de esgoto doméstico tratado para diversos fins tem sido uma prática que vem sendo difundida no mundo inteiro, contribuindo para diminuir os problemas resultantes da escassez, da má distribuição e da má qualidade da água” (PROSAB, 2010, p. 5). Essa afirmação caracteriza os atuais sistemas de tratamento de esgoto, que podem ser definidos como um "sistema de revestimento à base de alienação" e que deve ser transformado em tratamentos cíclicos, a fim de conservar a água e os recursos de nutrientes (SUALLI et al., 2012).

Deste modo, uma gestão integrada dos efluentes de estações de tratamento de esgoto, em que se considere a prática de reuso, constitui uma medida importante para evitar a poluição de corpos d'água por nutrientes, ao mesmo tempo em que proporciona o seu uso em atividades produtivas. Uma alternativa de reciclagem e reuso do esgoto doméstico é a inclusão de culturas de microalgas no tratamento de efluentes na remoção e/ou polimento de nitrogênio e fósforo (SUALLI et al., 2012).

Por sua vez, microalgas estão atualmente recebendo muita atenção devido a sua gama de utilidades. São micro-organismos fotossintetizantes que têm demonstrado o potencial para reduzir os problemas ambientais emergentes, como o efeito estufa, a poluição de águas residuárias e substituir as culturas de matérias-primas atuais para a produção de bicombustíveis (RAWAT et al., 2011).

Além disso, apresentam diferentes aplicações comerciais como: para fins alimentares, cosméticos e farmacêuticos. Algumas espécies produzem compostos bioativos, tais como antioxidantes antibióticos e

toxinas (SPOLAORE et al.,2006; GARCIA et al., 2009; CARBALLO et al., 2003 *apud* HARUN, 2010). Também são usadas como suplementos nutricionais para o consumo humano, devido à alta presença de proteínas, vitaminas e polissacarídeos em sua estrutura. No entanto, o custo do cultivo de microalgas é muito elevado, tais como o uso de produtos químicos durante o cultivo para obter uma densidade relativamente alta da cultura (HARUN, 2010).

Assim, a integração da produção de biomassa das microalgas e tratamento de efluente é considerada uma estratégia viável para redução de custos independente de sua finalidade. Porque as microalgas são capazes de assimilar poluentes orgânicos e inorgânicos em efluente doméstico e convertê-lo em componentes celulares, tais como lipídios e carboidratos, resultando na redução de poluentes e da produção de matéria-prima de biocombustíveis de forma ambientalmente amigável e produtiva. Dentre as espécies de microalgas, *Chlorella vulgaris* destaca-se por ser adequada para o cultivo de massa no exterior, candidata para produção de biodiesel, produzir elevado teor de lipídios entre outros (SUALLI et al., 2012).

Embasado neste contexto, o presente trabalho de conclusão de curso, realizado no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), visando avaliar o cultivo de microalgas com efluente doméstico da CASAN, ETE da Lagoa da Conceição, como meio alternativo de cultivo. Para isso foram realizadas três etapas: isolamento da *Chlorella vulgaris*, teste com três espécies de microalgas (*Desmodesmus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorococcales*) cultivadas no efluente doméstico tratado como meio de cultura alternativo, e o experimento principal, no qual foi comparando o cultivo em meio de cultura sintético WC com o meio de cultura alternativo (efluente).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o crescimento de microalgas *Chlorella vulgaris* no efluente doméstico.
- Quantificar a remoção de nutrientes pelas microalgas *Chlorella vulgaris*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem como objetivo apresentar um levantamento das bibliografias que serviram de alicerce para o presente trabalho, conferindo validação acadêmica aos resultados encontrados. São descritas algumas considerações sobre microalgas, cultivo de microalgas, suas restrições e polimento de efluente doméstico.

3.1 Microalgas

Microalgas estão entre as formas de vida mais antigas e primitivas no planeta, e têm sido utilizadas como fonte de vitaminas e proteína desde os tempos antigos. Exemplos são as civilizações do Oriente que usavam microalgas como parte importante de sua dieta e no Ocidente são conhecidas por sua alta qualidade nutricionais (BEWICKE et al., 1984).

Microalgas são definidas como organismos microscópicos e autotróficos que crescem através da fotossíntese, podendo ser encontradas em praticamente todos os nichos terrestres, água doce e salgada. Inclui em locais que apresentam grandes variações físicas e químicas (LOURENÇO, 2006).

O termo "alga" é desprovido de valor taxonômico, pois designa organismos muito distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia (RAVEN et al., 2007; DERNER et al., 2006, LOURENÇO, 2006). Acredita-se que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes de microalgas, o que revela um recurso praticamente inexplorado (NORTON et al., 1996; PULZ & GROSS, 2004 *apud* DERNER et al., 2006).

Quanto à classificação, ela está baseada em características como a estrutura da parede celular, tipo de mobilidade quando existente e tipos de pigmentos (DELABARY, 2012; MADIGAN et al., 2004).

Definem-se assim, dois tipos de estrutura celular: procariótica com representantes Cyanophyta e Prochlorophyta; e estrutura celular eucariótica, organelas que controlam as funções da célula, sendo classificadas em uma variedade de classes com representantes nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (DERNER et al., 2006; FALKOWSKI et al., 1997; HOEK et al., 1995). Na Tabela 1 são apresentadas as principais propriedades 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	Habitat
Chlorophyta	Alga verde	Unicelular folhosa	Clorofila a e b	Chlamydomonas	Amido	Celulose	água doce, solos
Euglenophyta	Euglenóide	Unicelular flagelada	Clorofila a e b	Euglena	Paramilo	Ausência de parede	água doce e marinha
Dinoflagellata	Dinoflagelados	Unicelular flagelada	Clorofila a e c, xantofila	Gonyaulax Pfiesteria	Amido	Celulose	principalmente marinha
Chrysophyta	Diatomácea	Unicelular	Clorofila a e c	Nitzschia	Lipídeos	Dois componentes sobrepostos, compostos por sílica	água doce, solos e marinha
Phaeophyta	Algas marrons	Filamentosa, folhosa, pode ser maciça	Clorofila a e c, xantofila	Laminaria	Lammarina	Celulose	marinhas
Rhodophyta	Algas vermelhas	Unicelular filamentososa folhosa	Clorofila a e d, xantofila, ficocianina, ficoeritrina	Polysiphonia	Amido das florídeas	Celulose	Marinhas

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

3.1.1 *Chlorella vulgaris*

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Chlorococcales

Família: Oocystaceae

Gênero: *Chlorella*

Espécie: *Chlorella vulgaris*

O nome *Chlorella* é composto do grego (*chloros*, que significa verde) e latim (*ella*, ou seja, pequeno ser), e foi descrito por M.W. Beyerinck da Holanda, em 1890 (KANNO, 2005). É uma alga unicelular que ocorre em água doce ou salgada e no solo, podendo ainda ser encontrada individualmente ou agrupada. Apresenta célula esférica, diâmetro entre 3 e 10 µm, composta por um único cloroplasto em forma de taça, com ou sem pirenoide e um único núcleo muito pequeno. A reprodução é assexuada pelo fato de as células serem imóveis (DELABARY, 2012; RAVEN et al., 2007; ROGERS, 2005).

Chlorella vulgaris tem sido amplamente utilizada em estudos fotossintéticos, em experiências de cultivo em massa, e para a purificação de efluente de águas residuárias. Sua escolha é justificada pela alta capacidade de multiplicar-se rapidamente e ser rica em proteínas e vitaminas do complexo

B. Também tem sido estudada como um produto potencial de alimento para os seres humanos (ROGERS, 2005).

A principal forma de reserva da *Chlorella* é o amido e em certas circunstâncias pode armazenar óleo, que pode ser sintetizado e acumulado sob estresse ambiental e nutricional, como alta irradiância, alta concentração de ferro, e deficiência de nitrogênio ou fosfato (LI et al., 2010; LIU et al., 2008; KHOTIMCHENKO, 2005 *apud* SHU et al., 2013). Com isso, as propriedades do óleo são comparáveis ao petróleo fóssil, tornando-o adequado como uma matéria-prima para a produção de biocombustível, ou seja, espécies de *Chlorella* podem ser candidatas para a produção de biocombustíveis. Na Figura 1 é apresentada uma imagem da *Chlorella vulgaris* no microscópio.

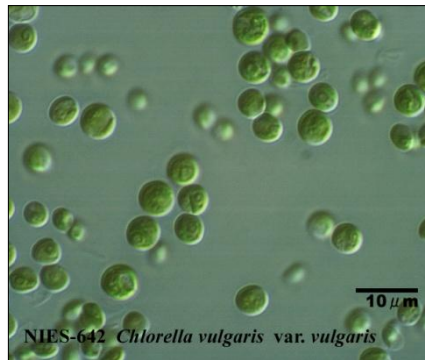


Figura 1 - *Chlorella vulgaris*

Fonte: MORI et al., 2002.

3.2 Cultivos de Microalgas

De acordo com BOROWITZKA (1988, *apud* DERNER et al., 2006, p. 1960), microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de produção, com volume variando desde poucos litros até bilhões de litros. Esses sistemas são praticados há quase 140 anos, entretanto nas últimas décadas houve avanços tecnológicos que tem aprimorado a compreensão do potencial biotecnológico destes micro-organismos (LOURENÇO, 2006; RICHMOND, 2004).

Segundo DERNER (2006), a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por empresas, localizadas no litoral de Santa Catarina e a Região Nordeste, com o foco na produção de biomassa para

utilização na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos.

O cultivo de microalgas é definido como um sistema biológico eficiente na utilização da energia para a produção de matéria orgânica, sendo que muitas espécies crescem mais rapidamente que as plantas terrestres por unidade de área, fato que possibilita maiores rendimentos de biomassa. (GALINDRO, 2012; DERNER et al., 2006).

3.2.1 Tipos de cultivos

Lourenço (2006) apresenta quatro tipos básicos de cultivos quanto à forma de produzir células:

- Cultivos em batelada ou estanques - caracterizados pelas modificações intensas na composição do meio de cultura;
- Cultivos semicontínuos - uma parcela do meio de cultivo com as algas é removida e substituída por meio de cultura nova, sem células;
- Cultivos contínuos - processo permanente de saída de cultura com as células de microalgas e entrada de meio esterilizado no recipiente de cultivo;
- Cultivos massivos - para finalidades biotecnológicas, cuja produção é em grande escala, em tanques ou outros recipientes de grande volume.

Na Figura 2 é apresentado o cultivo em escala laboratorial que representa os cultivos em batelada, semicontínuos, contínuos.



Figura 2 - Cultivos em escala laboratorial
Fonte: SÉSTON, 2013.

Lourenço (2006), também classifica os cultivos quanto ao número de espécies de microalgas presentes no meio: monoalgáceo e misto; quanto ao teor de nutrientes dissolvidos; quanto ao uso do cultivo; quanto às características genéticas das microalgas e quanto à presença de microbianos.

Já Harun (2010) classifica os cultivos em sistemas abertos e fechados. Exemplos são os tipos de lagoas que estão sendo usados atualmente em pesquisa e na indústria, incluindo lagoas raceway, grandes lagos, lagoas rasas tanques circulares e tanques fechados.

Sistema aberto

Segundo Harun (2010), uso de tanques abertos como um método para o cultivo de microalgas é bastante comum, apresentando uma diversidade de formas e tamanhos.

Esses cultivos são geralmente conduzidos em tanques abertos expostos ao ambiente. Quanto ao tamanho, os tanques abertos podem ser classificados como pista (raceway), circular, lagoas inclinadas e sem mistura. Construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, com fundo de terra ou revestido com material plástico, sendo que as culturas são constantemente agitadas (SUALLI et al., 2012).

Os tanques abertos são mantidos sob condições naturais de iluminação e temperatura, sendo talvez o mais adequado para o cultivo de microalgas em sistema fototrófico para a produção de biodiesel devido ao seu baixo custo operacional e a fonte de carbono pode ser obtida diretamente da atmosfera (BRENNAN et al., 2010). Por outro lado, essas condições naturais são a chave limitante de parâmetros como temperatura, crescimento, pH, concentração de oxigênio dissolvido. (MASOJIDEK, 2008; LEE, 2001 *apud* HARUN et al., 2010). Na Figura 3 é apresentado um exemplo de tanque aberto.



Figura 3 - Tanque aberto
Fonte: SESTON, 2013.

Sistema fechado

Denominado fotobiorreator (“photobioreactor”), ou cultivo em sistema fechado visa alcançar elevadíssima produtividade, sendo esta o indicador mais importante para o sucesso desta tecnologia. Apresentam-se em diferentes gamas de modelos, painéis de forma achatada ou em serpentinas, espirais ou cilindros, construídos com tubos de plástico, vidro ou policarbonato (HARUN et al, 2010; DERNER et al, 2006; TREDICI, 2004; BOROWITZKA, 1993).

O cultivo em sistema fechado apresenta menor contaminação e que pode ser facilmente controlada, ou seja, se obtém um maior controle sobre a maior parte dos parâmetros em comparação aos sistemas abertos de lagoas (CHISTI, 2007).

A seleção de um sistema de cultivo depende do produto final: para a produção de biocombustíveis, as microalgas podem ser cultivadas tanto em sistemas fechados ou abertos. Para indústria farmacêutica a produção, no entanto, requer menor contaminação e, assim, apenas devem ser empregados os sistemas fechados (SAULLI et al., 2010). Na Figura 4 é apresentado o sistema fechado de cultivo, fotobiorreatores.



Figura 4 - Fotobiorreator
 Fonte: NPDEAS, 2013.

Uma questão a ser considerada é o custo de um sistema de cultivo de microalgas. Um fator vital quando se comparam sistemas de cultivo fechados e abertos. Os custos de construção, operação e manutenção de tanques de cultivo são mais baixos do que as opções de fotobiorreatores, entretanto o sistema aberto requer maior área e alcança uma concentração de biomassa relativamente menor. Já os fotobiorreatores, necessitam de maior técnica em design, logística, concepção entre outros (HARUM, et al., 2010). Na Tabela 2 é apresentado os diversos fatores que são levados em conta para a escolha do sistema aberto ou fechado.

Tabela 2 - Comparação dos métodos de cultivo

FATOR	TANQUE	BIORREATOR
Espaço necessário	Alto	Baixo
A perda de água	Muito alto	Baixo
Perda de CO ₂	Alta depende da	Baixo

	profundidade da lagoa.	
A concentração de oxigênio	Baixa devido à troca espontânea	Ocorre acúmulo, requer um dispositivo de troca de gás.
Temperatura	Altamente viável	Resfriamento necessário
Queimar	Baixo	Alto
Limpeza	Nenhum	Necessário, aparecimento de sujeira na parede.
Contaminação	Alto	Nenhum
Evaporação	Alto	Não evapora
Qualidade da biomassa	Variável	Reprodutível
Custo de colheita	Alto	Abaixe
Microbiologia segurança	Nenhum	UV
Sistema de resfriamento automático	Nenhum	Construído
Sistema de aquecimento automático	Nenhum	Construído
Bomba de ar	Construído em	Construído
Exigência de energia (W)	4000	1800

Fonte: ADAPTADA por PULZ, 2004.

Na Tabela 3 é relacionado à seleção de algumas espécies de microalgas e métodos de cultivo.

Tabela 3 - Espécies de microalgas e seus métodos de cultivo

ESPÉCIE/ GRUPOS	MÉTODO DE CULTIVO	REFERÊNCIAS
<i>Spirulina, Arthrospira platensis</i> / Cyanophyta	Tanques abertos, lagos naturais.	GROBBELAAR, 2007.
<i>Chlorella vulgaris</i> / Chlorophyta	Tanques abertos, bacias, tubos abertos, fotobiorreatores.	BABEL et al., 2002; RAMOS, 1986.
<i>Dunaliella salina</i> / Chlorophyta	Lagoas abertas, fotobiorreatores	ZHU, 2008; TAFRESHI et al., 2006.
<i>Haematococcus pluvialis</i> / Chlorophyta	Lagoas abertas, fotobiorreatores	VEGA et al., 2005; OLAIZOLA et al., 2000.
<i>Porphyridium cruentum</i> / Rhodophyta	Fotobiorreatores tubular	SUN et al., 2008; MULLER et al., 2003.
<i>Muriellopsis sp.</i> / Chlorophyta	Lagoas abertas e fotobiorreatores	BLANCO et al 2007; DEL CAMPO et al., 2001.

Fonte: Adaptada por PULZ, 2004 apud HARUN, 2010.

3.2.2 Condições de cultivo

As condições ambientais para o cultivo de microalgas estão relacionadas principalmente com fatores biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos estão associados às próprias taxas metabólicas de espécies cultivadas e a interferência de outros organismos. Os fatores físico-químicos

estão relacionados com temperatura, iluminação, salinidade e disponibilidade de nutrientes (YONGMANITCHAI; EPPLEY, 1977; GUILLARD, 1975; HELLENBUST, 1970 *apud* DERNER, 2006).

Assim, 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; BERENGUEL et al., 2004; MOLINA et al., 1999).

3.2.2.1 Intensidade da luz

A intensidade da luz tem efeito diferente sobre as espécies de microalgas, por isso algumas espécies necessitam de mais ou menos energia da luz para conduzir o processo da fotossíntese (SAULI et al., 2012). A variação da luz no espaço e no tempo implica ser este um fator condicionante no crescimento (DERNER, 2006).

Segundo Pulz e Scheinbenbogen (1998), atividade fotossintética progride com o aumento da irradiação até determinados valores, posteriormente começa a ocorrer inibição do crescimento celular, através de um fenômeno conhecido por fotoinibição.

O ciclo claro-escuro na fotossíntese, do processo de cultivo, foi mostrado ter um efeito sobre o teor de lipídios da célula durante a segunda fase (RAWAT et al., 2011).

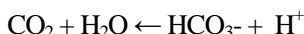
3.2.2.2 Temperatura

Temperaturas constantes são desejáveis no cultivo das algas, pois proporcionam mais estabilidade em experimentos e mesmo em operações de rotina de cultivo. Para isso, a estabilidade térmica de uma sala climatizada pode ser obtida por meio da instalação de sistemas de refrigeração robustos e uso de câmaras incubadoras (LOURENÇO, 2006).

A temperatura ótima para o crescimento de microalgas e cianobactérias, situa-se geralmente entre 25°C a 35°C (COLLIER et al., 1994). Apenas um pequeno número de espécies de microalgas pode ser cultivado sob condições de alta temperatura, na gama de 30°-40°, incluindo *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiana* e *Chlorella sp.* (SAKAI et al., 1995). A temperatura é um dos fatores mais importante quanto ao crescimento e à atividade da biomassa, ou seja, atua na estrutura dos componentes celulares (síntese de proteínas e lipídios) e indica relação com coeficientes cinéticos, os quais dependem das energias de ativação das reações (LOURENÇO, 2006).

3.2.2.3 pH

O aumento do pH está em função da atividade fotossintética. Um dos fatores biológicos que pode afetar o pH e a alcalinidade da água de cultivo é a fotossíntese. Com a remoção de CO₂ da água durante a fotossíntese, há elevação do pH da água pelo consequente consumo de íons H⁺, como pode ser visto na seguinte reação (BOYD, 1979):



De acordo com Lee, Apel e Walton (2006), o aumento do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico pelo crescimento celular.

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).

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 et al., 1989).

3.2.2.4 Disponibilidade de CO₂

O dióxido de carbono é a principal fonte de carbono em cultivos fotossintéticos (LOURENÇO, 2006). Estudos mostram que é na segunda fase de cultivo onde há maior biomassa, consequentemente de maior consumo de CO₂. No início do cultivo, como são poucas células, é necessário pouco CO₂ (DERNER, et al., 2006).

3.2.2.5 Nutrientes

A concentração dos nutrientes, que é um fator químico, interfere no crescimento das microalgas, podendo ser classificados como macronutrientes e micronutrientes, de acordo com a quantidade requerida. O termo é particularmente utilizado para fazer referência às substâncias consumidas por produtores primários (LOURENÇO, 2006).

Compostos de nitrogênio e fósforo, considerados macronutrientes, apresentam maior grau de importância, bem como o carbono, para as microalgas (LOURENÇO, 2006). O fósforo forma diversos componentes estruturais e funcionais necessários para o crescimento normal e desenvolvimento das microalgas, sendo incorporados na forma de ortofosfato e polifosfatos, representando 1% do peso seco celular (HU et al., 2004; HEALEY et al., 1982; GOLDMAN, 1981).

Nitrogênio é um componente importante da biomassa de microalgas, pois participa da formação de proteínas. As principais fontes de nitrogênio são as fontes inorgânicas, como o nitrato, nitrito e amônio e as fontes orgânicas, ureia, aminoácido livre e peptídeos (PADISÁK 2004; GUMARÃES, 2009, apud DELABARY, 2012).

Outros nutrientes como hidrogênio, oxigênio e sílica são necessários para manutenção e crescimento de culturas de microalgas. Assim como cálcio, magnésio, enxofre e potássio, que devem estar presentes em quantidade relativamente grande e por isso são chamados de macronutrientes. Por serem exigidos em menor quantidade, ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto são denominados micronutrientes (GUILLARD, 1975).

3.3 Meios de Cultivo

De acordo com Lourenço (2006), meios de cultura podem ser definidos como o ambiente específico e finito que contém os nutrientes e elementos necessários ao desenvolvimento de vegetais, animais e micro-organismos em cultivo. Pode ser classificado em:

- Definidos - todos os componentes químicos adicionados são conhecidos qualitativamente e suas concentrações são quantitativamente controladas;
- Indefinidos - os componentes químicos são desconhecidos, ou, se parcialmente conhecidos e concentrações indeterminadas;
- Semidefinidos - os principais componentes são conhecidos, mas suas concentrações não são determinadas com exatidão.

Ainda podem ser líquidos ou sólidos. Um exemplo de meio de cultivo ideal é a água do mar para o crescimento de algas marinhas. Este por sua vez, é um meio extremamente complexo, com um número grande e altamente variável de compostos orgânicos. Entretanto, muitos elementos estão presentes na água do mar em quantidades limitadas. Assim como a água do mar, há diversos tipos de meios sintéticos, ou seja, enriquecidos com nutrientes, tanto para água salgada como para água doce (LOURENÇO, 2006).

Águas residuárias podem conter nutrientes abundantes, como o ferro, nitrogênio e fósforo, os quais são necessários para o crescimento das microalgas (KAWAT et al., 2011).

3.4 Biomassa e suas aplicações

A biomassa microalgal e os extratos de biomassa estão ganhando destaque no mercado mundial por conterem diversas substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), proteínas imunologicamente efetivas e compostos virostáticos, por exemplo, (COHEN; 1999, *apud* BERTOLDI et al., 2008).

A técnica para obtenção da biomassa depende de características da microalga como tamanho e densidade. Esse processo é dividido em duas fases: a primeira, a qual visa concentrar a biomassa suspensa, onde emprega tecnologias incluindo floculação, flotação ou gravidade e sedimentação; e a segunda fase com objetivo de separar a pasta formada na primeira etapa utilizando técnicas como centrifugação, filtração e ultrassons (OLAIZOLA, 2000).

Além das substâncias citadas, há outras aplicações das microalgas:

3.4.1 Biodiesel

Para substituir o combustível convencional por biocombustíveis são necessários: matéria-prima suficiente em escala comercial custa mais baixo do que o combustível fóssil convencional corresponder à especificação padrão da qualidade do combustível. Com base nisso, as microalgas têm potencial para serem utilizadas como matéria-prima para a produção de biodiesel, por possuírem elevada produtividade e significativa fração de lipídica. Apresentam ainda a característica lipídica de serem neutras com menor grau de instauração, acentuando o seu potencial para substituir o combustível fóssil (HARUN et al., 2011).

Segundo Miao (2006) e Widjaja (2009) as vantagens na escolha de microalgas para substituir o combustível fóssil são:

- Maior produtividade de óleo (pelo menos 15-20 vezes maior rendimento de óleo por hectare do que as culturas convencionais).
- Reprodução rápida (duplicação da biomassa dentro de 3,5 h durante o crescimento exponencial).
- Não requerem necessariamente terras aráveis e água de alta qualidade.
- Sequestram de CO₂ e podem servir como tratamento de águas residuais (assimilam CO₂, juntamente com nitratos e fosfatos).
- São ricas em coprodutos valiosos (*Spirulina* e biomassa para alimentação animal).

- Requerem muito menos áreas de terra em comparação com as culturas convencionais.

3.4.2 Bioetanol

Segundo Asha (2011), microalgas são capazes de secretar glicose e sacarose, açúcares simples, através da fermentação anaeróbia.

Dentre os biocombustíveis competitivos, o etanol pode ser extraído diretamente a partir dos meios de cultura, eliminando a necessidade de separar a biomassa a partir da água e extrair com posterior processamento dos óleos. Porém, ainda existe uma ponte para a produção em larga escala para alcançarem esses resultados (ASHA, 2011).

Outra maneira de microalgas fornecerem hidratos de carbono e proteínas é a partir de biomassa: processo bioquímico (fermentação) e processo termoquímico (gaseificação) (HARUN, 2010).

Além do etanol, outros bioquímicos com algas são ideais como matéria-prima para a produção de produtos com singularidades químicas como biobutanol, solvente orgânico valioso, e a acetona. Exemplos de microalgas com potencial a esse processo de bioetanol é a *Clostridium sp.* (HARUN, 2010).

3.4.3 Bio-hidrogênio

Microalgas podem ser usadas para a produção de moléculas de hidrogênio (H_2), um possível portador de energia do futuro, onde tem sido objeto de várias revisões (SAKURAI et al., 2007; TAMAGNINI et al., 2007; LEVIN et al., 2004).

A produção biológica de hidrogênio apresenta diversas vantagens sobre a produção de hidrogênio por fotoeletroquímica ou processos termoquímicos. Uma delas, fotossíntese de microorganismos, requer a utilização de um simples reator solar, enquanto que a produção de hidrogênio via eletroquímica necessita da separação da água à base de bateria solar (ASHA, 2011).

3.4.4 Óleos e Omega 3

Naturalmente microalgas contêm Omega 3, ácido gordo, que pode ser purificada para proporcionar suplemento alimentar de elevado valor. As fontes funcionais de Omega 3 em microalgas são normalmente ácido eicosapentanóico (EPA) e ácido decosaheptaenoico (DHA) (LUTEM et al.,

2006). O DHA é utilizado para benefícios de saúde: ajudam a combater o câncer, AIDS, doenças do coração, diminuir o colesterol, estimular o sistema imunitário e desintoxicar o corpo. Já EPA tem sido usado para fins clínicos, tais como, por tratamento do coração e doenças inflamatórias, asma, artrite, enxaquecas e psoríase (SINGH et al., 2005).

3.4.5 Pigmentos

Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995, *apud* DERNER, 2006).

A clorofila tem função de agente quelante, utilizado em benefícios farmacêuticos especialmente de recuperação do fígado e tratamento da úlcera. Além disso, ela repara as células, aumenta a hemoglobina no sangue (PUOTINEN, 1999 *apud* BRENNAN et al., 2010). Também tem sido investigada como fonte de pigmentos em produtos cosméticos. Outras como algas marrons e vermelhas são usadas principalmente nas indústrias de cosméticos (ERICA M, 1996).

Carotenóides, pigmentos fotossintéticos secundários, presente nas células microalgais como, por exemplo, betacaroteno, astaxantina utilizado como corante e antioxidante (PULZ, 2004).

3.4.6 Nutrição humana

Restrito a poucas espécies, o consumo humano de biomassa de microalgas devido às rígidas normas de segurança alimentar, fatores comerciais, a demanda de mercado e preparação específica faz com que *Chlorella* e *Dunaliella* dominem o mercado. A biomassa é comercializada em forma de comprimido ou pó como aditivos alimentares (PULZ, 2004 *apud* BRENNAN, 2010). A *Chlorella*, por exemplo, é utilizada para uso medicinal na proteção contra falência renal e promover o crescimento de *Lactobacillus* intestinal (YAMAGUCHI, 1996).

Entretanto, a ingestão de algumas espécies pode ser maléfica a saúde humana. Estudos mostram que *Spirulina* produz compostos que estão ligados ao complexo de demência e esclerose (COX et al., 2005).

3.4.7 Alimento animal

Parte da energia produzida durante a fotossíntese é assimilada pelos organismos como peixes, moluscos e crustáceos que as utilizam como

principal fonte de alimentação, denominados 21 consumidores primários, garantindo o fluxo de energia ao longo das cadeias tróficas (ARREDONDO-VEGA, 1995 *apud* GALINDRO, 2012).

Outro produto útil a partir de algas é a alimentação do gado. Um grande número de algas foi testado suas composições bioquímicas a serem utilizadas como suplemento alimentar para animais ou como alimento para gado primário (HARUN et al., 2010).

3.4.8 Outras aplicações

Além das aplicações citadas acima, microalgas podem ser usadas na mitigação do efeito estufa, pela assimilação do CO₂, resultado do processo de queima dos combustíveis fósseis e de práticas agrícolas impróprias (DERNER et al., 2006).

As altas concentrações de lipídios, nas microalgas podem servir de matéria-prima para fabricação de detergentes, borracha, compostos graxos nitrogenados, graxa, tecidos, aditivos alimentares, cosméticos e medicamentos (AARONSON, et al 1982; *apud* BERTOLDI et al., 2006).

3.5 Polimento de efluente com microalgas

A utilização de microalgas como pós-tratamento, polimento, de águas residuárias iniciou em meados dos anos 50, porém foi na década de 1970 que os projetos alavancaram. 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 incorporar os nutrientes, favorecendo tanto ao ambiente, quanto á energia (LOURENÇO, 2006). Essa proposta foi difundida nos Estados Unidos por Oswald e Gotas (1957) e foi intensivamente testada em muitos países (DE PAUW et al., 1983; SHELEF, 1980; GOLDMAN, 1979, *apud* DELABARY, 2012).

Chlorella vulgaris, por exemplo, cultivada em água residuárias de uma fábrica de aço teve o objetivo de desenvolver um sistema economicamente viável para a remoção de amônia e CO₂ (BRENNAN et al., 2010; HUANG et al., 2010).

O cultivo de microalgas em esgoto e estação de tratamento de águas residuais é esperado para trazer benefício duplo para o ambiente, uma vez que eles podem ser usados para extrair os nutrientes de águas residuárias, convertê-la em gorduras para a produção de biodiesel e reduz a poluição da atmosfera. Esta abordagem se baseia em "algas selvagens", ou seja, algas que

colonizam naturalmente em lagoas de esgoto (METCALF; EDDY, 1980 apud ASHA, 2011).

Ainda no cultivo, algas podem aumentar o desempenho de degradação, melhorando CO₂, equilíbrio e reduz a demanda de energia para fornecimento de oxigênio em etapas de tratamento aeróbio (HARUN, 2010).

Podem também assimilar no efluente, metais pesados. Um estudo semelhante mostrou algas marrons *Fucus vesiculosus*, apresentaram maior eficiência na remoção de cromo (III) em 13 concentrações iniciais de metal (MURPHY, 2008). No entanto, fatores de contaminação por metais pesados exigem maior atenção do que na produção convencional de mídia. Outras considerações devem ser levadas em conta pelo fato de conter nas águas residuais azoto na forma de amoníaco, que em elevadas concentrações pode ter efeitos de inibição do crescimento de algas por bactérias patogênicas, zooplâncton predatório (PARK et al, 2010 apud RAWAT, 2010). Na tabela 4 são identificadas a contribuição das microalgas para degradação de poluentes ambientais.

Tabela 4 - Microalgas contribui para degradação de poluentes ambientais

Microalgas	Microalgas aquáticas	Tipos de águas residuais
<i>Prototheca zopfil</i>	Água doce	Hidrocarbonetos de petróleo degradados encontrados na Louisiana bruto e resíduos de óleos de motor.
<i>Chlamydomonas espécies</i>	Água doce	Meta clivagem nas águas residuais.
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Água doce e salobra	Degradação de corantes azo de águas residuais.
<i>Chlorella sp.</i>	Água doce e marinha	Anaeróbia dos resíduos de leite digerido.
<i>Ankistrodesmuse Scenedesmus quadricauda</i>	Água doce	Águas residuais, fábrica de óleo e efluentes da indústria de papel.

<i>Spirulina plansis</i>	Água doce e salobra	Tratamento de esgoto doméstico.
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Água doce	Tratamento de águas residuais em condições heterotróficas aeróbicas escuras.
<i>Botryococcus braunii</i>	Água doce	Secundariamente esgotos tratados em processos descontínuos e processos contínuos
<i>Scenedesmus</i>	Água doce	Remoção de amônia a partir de digestão anaeróbia de efluentes que contém altos níveis de amônia e alcalinidade.

Fonte: ASHA et al., 2011.

3.5.1 Efluente doméstico

Segundo a Fundação Nacional (2004), esgotos domésticos provem principalmente de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou quaisquer edificações que dispõem de instalações com banheiros, lavanderias e cozinhas. Compõem-se essencialmente da água de banho, papel higiênico, restos de comida, sabão, detergente e águas de lavagem.

Uma vez que é necessária que atenda as exigências do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA – para lançamentos em corpos d’água, faz-se necessário o tratamento de efluente doméstico. Este por sua vez, é um processo onde os contaminantes são removidos para produzir um fluxo de resíduos adequado para descarga ou reutilização. (PROSAB, 2009).

O tratamento tem início a partir do processo de tratamento primário, onde os sólidos, óleos e gorduras são removidos; o tratamento secundário elimina produtos químicos presentes no efluente e ao final é realizado o tratamento terciário, o que remove os nutrientes de águas residuais antes de serem descartados nos rios (RAWAT et al., 2011).

Mesmo tratado, o lançamento de efluente doméstico em corpos d'água pode resultar na poluição, trazendo grandes desafios ambientais para os corpos d'água que recebem. O principal efeito da liberação de efluentes ricos em compostos orgânicos e produtos químicos inorgânicos, como fosfatos e nitratos é principalmente eutrofização (MULBRY, 2008; OLGLIN, 2003; GODOS, 2009).

3.5.2 Eutrofização

Eutrofização é o enriquecimento do meio aquático com nutrientes, causando o crescimento de organismos e plantas aquáticas, tanto planctônicas quanto aderidas, que podem atingir níveis tais que sejam causadores de interferências aos usos desejáveis do corpo d'água. Normalmente, o maior fator de preocupação são as algas, cujo crescimento depende do aporte de nutrientes como nitrogênio e fósforo (PROSAB, 2010, p 32).

Os principais efeitos indesejáveis da eutrofização são (SPERLING, 2005, apud PROSAB, 2009):

- Problemas estéticos e recreacionais;
- Condições anaeróbias no fundo do corpo d'água, ocasionando o aumento da produtividade do corpo d'água que causa uma elevação da concentração de bactérias heterotróficas que se alimentam da matéria orgânica das algas e de outros microrganismos mortos, consumindo oxigênio dissolvido do meio líquido. Predominam compostos redutores como o ferro e o manganês na forma solúvel, o fosfato, representando uma fonte interna de fósforo para as algas e o gás sulfídrico pode causar problemas de toxicidade e maus odores;
- Eventuais mortandades de peixes - causada pela toxidade por amônia;
- Maior dificuldade e elevação dos custos de tratamento da água;
- Problemas com o abastecimento de águas industriais;
- Toxicidade com algas;
- Modificações na qualidade e quantidade de peixes de valor comercial.

O problema global da eutrofização pode ser resolvido pelo uso de culturas de microalgas em águas residuárias tratadas. A vantagem é que, enquanto as microalgas estarão removendo o excesso de nutrientes na água residual, não haverá acumulação concomitante de biomassa para o processamento a jusante (MULBRY, 2008; MUNOZ, 2008; PITMAN, 2010). A utilização de uma vasta gama de microalgas tais como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas* e *Spirulina* para

o tratamento de efluente doméstico foi avaliado a eficácia deste método(KONG et al., 2010, *apud* KAWAT, 2010).

3.5.3 Nitrogênio e fósforo no efluente doméstico

O nitrogênio no efluente é um componente de grande importância em termos de degradação e também do próprio controle da poluição das águas, bem como elemento indispensável para o crescimento dos microrganismos responsáveis pelo tratamento de esgoto. Ele se altera entre várias formas e estado de oxidação (SPERLING, 2009). Na Tabela 5 foi apresentado um resumo das formas de nitrogênio segundo distintas condições.

Tabela 5 - Distribuição relativa das formas de nitrogênio segundo distintas condições.

CONDIÇÃO	FORMAS PREDOMINANTES DO NITROGÊNIO
Esgoto bruto	Nitrogênio orgânico Amônia
Poluição recente em um curso de água	Nitrogênio orgânico Amônia
Estágio intermediário da poluição em um curso de água	Nitrogênio orgânico Amônia Nitrito (em menores concentrações) Nitrato
Poluição remota em cursos de água.	Nitrato
Efluente de tratamento sem nitrificação	Nitrogênio orgânico (em menores concentrações)
Efluente de tratamento com nitrificação	Amônia Nitrato
Efluente de tratamento com nitrificação/desnitrificação	Concentrações mais reduzidas de todas as formas de nitrogênio

Fonte: VON SPERLING, 2005.

O fósforo tem origem natural da dissolução de compostos do solo, decomposição da matéria orgânica, fósforo de composição celular de microorganismos e origem antropogênica de despejos domésticos, despejos industriais, detergentes, excrementos de animais e fertilizantes (SPERLING, 2005). O fósforo total encontra-se no efluente doméstico como fosfatos inorgânicos (polifosfatos e ortofosfatos) e orgânicos (ligada a compostos orgânicos) sendo a forma predominante o HPO_4 (IAWQ, 1995, *apud* PROSAB, 2009).

4 METODOLOGIA

4.1 Laboratório de Cultivo de Algas (LCA)

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo de Algas (LCA), Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, e encontra-se instalado junto ao Laboratório de Camarões Marinhos, na Estação de Maricultura da Barra da Lagoa, Ilha de Santa Catarina, SC. Dispõe de infraestrutura específica para o desenvolvimento de pesquisas e cultivos de microalgas (marinhas e dulcícolas) desde pequena escala até cultivos massivos em tanques de 10.000 litros.

As linhas de pesquisa do LCA estão direcionadas à aplicação comercial das microalgas visando à produção de biocombustíveis (biodiesel, por exemplo), obtenção de compostos bioativos (ácidos graxos poli-insaturados, pigmentos e carboidratos) de interesse das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética e para o tratamento de efluentes líquidos e gasosos (biofixação de carbono).

4.2 Estação de tratamento de esgoto sanitário (ETE) – CASAN

O efluente doméstico foi coletado na Estação de Tratamento de Esgoto da Lagoa da Conceição da CASAN, no município de Florianópolis, Santa Catarina.

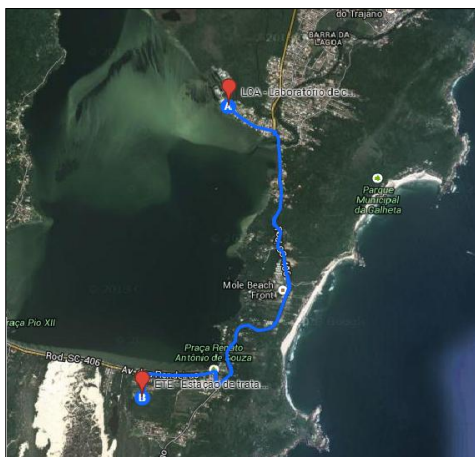
O sistema de esgotamento sanitário da Lagoa da Conceição foi projetado para atender 36.000 habitantes, compreendendo as regiões do Centrinho da Lagoa, parte da Avenida Osni Ortiga, Avenida das Rendeiras, prolongando-se até a Praia da Joaquina e Retiro da Lagoa.

A unidade operacional conta com processos físicos, químicos e biológicos que removem as cargas poluentes do esgoto, devolvendo ao

ambiente o produto final, efluente tratado. O pré-tratamento é composto por gradeamento, caixa de areia e caixa de gordura. O tratamento secundário por sua vez, é composto por dois valos de oxidação, decantador secundário e leito de secagem. O efluente líquido tratado, após decantador secundário, é encaminhado até uma depressão natural nas dunas, formando uma lagoa de evaporação e infiltração na areia. Já o lodo é recirculado e o excesso disposto em leito de secagem.

A escolha dessa estação de tratamento é devido à parceria existente com o LCA, onde foram coletados efluentes em experimentos e projetos anteriores. Na foto 5 foi apresentada a localização do LCA e a ETE.

Figura 5 - Localização do LCA e ETE



4.3 Etapas do experimento

O processo para realização do experimento foi dividido em três etapas. A etapa 1 foi realizada no verão no mês de janeiro, a etapa 2 ocorreu no outono, final do mês de março e a etapa 3 foi realizada no final do outono, mês de junho. Na figura 6 foi apresentado o fluxograma das 3 etapas com suas subetapas.

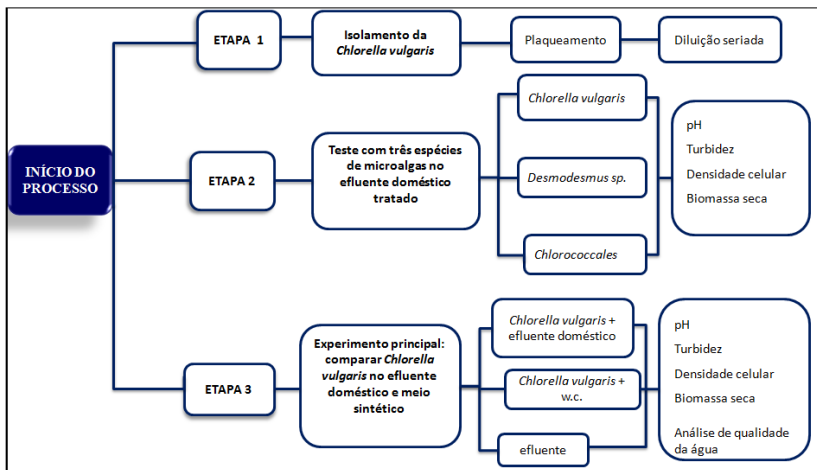


Figura 6 - Fluxograma das etapas do experimento.

4.3.1 Etapa 1

O isolamento de *Chlorella vulgaris* ocorreu a partir de uma amostra de água doce recolhida em um raceway piloto de um projeto de doutorado, localizado ao ar livre no LCA no início de 2013. O método utilizado para o isolamento foi através de plaqueamento com placa de Petri preenchida com meio sólido (Agar 2% e meio sintético WC), manipulada com alça bacteriológica, mantido em câmara de germinação a 14 °C, fotoperíodo 12:12. Posteriormente foi feita diluição seriada.

4.3.2 Etapa 2

Três cepas de microalgas: *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus sp.* e *Chlorococcales* foram selecionadas para a segunda etapa do experimento. *Desmodesmus sp.* foi escolhida por ser uma candidata do Projeto “Potencial biotecnológico das microalgas para a produção de biodiesel” – MCTI/UFSC/FAPEU e “Pesquisa sobre a separação da biomassa de microalgas visando à produção de biodiesel” desenvolvida no laboratório. *Chlorella vulgaris* foi selecionada por ser uma espécie nativa, resistente e por apresentar algumas características necessárias para a produção de biodiesel (HARUN, 2011). Por fim, *Chlorococcales* também foi encontrada no raceway e é da mesma ordem que a *Chlorella vulgaris*. Essa etapa foi realizada no final do mês de março, outono, durante 14 dias. Como meio de cultura alternativo foi utilizado o efluente doméstico tratado da CASAN.

Foram utilizados três erlenmeyer de 2000 mL com um volume total de 1000 mL, ou seja, 500 mL de efluente tratado e 500 mL de inóculo. Foram medidos diariamente parâmetros de turbidez, pH e densidade celular, através de contagem direta com microscópio de luz e câmara de Neubauer.

A cada dois dias eram determinados a biomassa seca de microalgas. Inicialmente o filtro de fibra de vidro 0,7 μm foi "queimado" em estufa a 105°C durante 1 hora e meia, posteriormente filtradas com um volume determinado e por fim, seco em estufa a 60°C durante 24 horas. Na figura 8 foi apresentado a imagem da etapa 2.

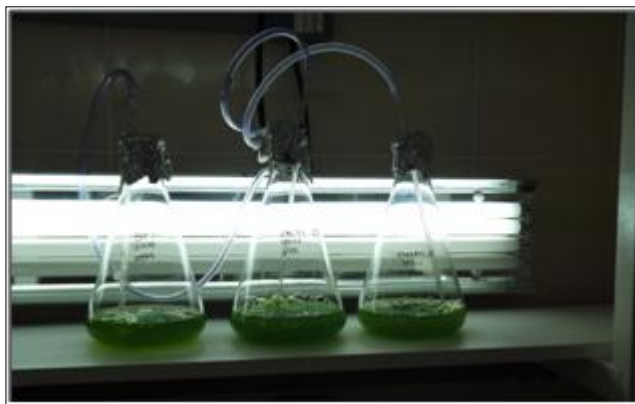


Figura 8 - Etapa 2

4.3.3 Etapa 3

A etapa 3 ocorreu no final do outono, mês de junho tendo início com a aclimação prévia da cepa. O inóculo foi utilizado em fase exponencial, após o período de aclimação, quando as células estavam adaptadas às condições experimentais.

As condições experimentais foram semelhantes à etapa 2. Entre as diferenças estabelecidas o volume total para cada erlenmeyer de 2000 mL foi

de 1500 mL, ou seja, 1000 mL de efluente doméstico tratado e 500 mL de inoculo.

Essa etapa consistiu em três tratamentos experimentais diferentes em triplicata colocados em erlenmeyer de 2000 mL com aeração. O primeiro tratamento, denominado de controle, foi composto por 1 litro e meio de efluente doméstico tratado, o segundo tratamento foi composto por 1 litro de meio de cultura sintético WC e o inoculo da *Chlorella vulgaris* e o terceiro tratamento foi constituído por 1 litro de meio de cultura alternativo de efluente doméstico tratado e o inoculo da *Chlorella vulgaris*. Na figura 9 foi apresentado a imagem da etapa 3, experimento principal.



Figura 9 – Etapa 3

4.3.3.1 Características dos meios

O efluente utilizado como meio de cultura alternativo na etapa 3, experimento principal foi coletado no final de uma estação de tratamento de esgoto (ETE), tratamento secundário, após o decantador secundário. Como etapa final, a ETE utiliza hipoclorito de sódio para desinfecção do efluente. O volume coletado na ETE foi de 10 litros, com amostragem composta. Para garantir a desinfecção do efluente foi clorado durante uma hora, numa proporção de 1 mL/L e neutralizado com tio sulfato, 0,5 mL/L.

Os parâmetros de qualidade de água do efluente tratado pela ETE apresentados na Tabela 6 são referentes à média de duas avaliações, uma do

mês que ocorreu a etapa 2 e a segunda do mês em que a etapa 3 foi executado. Os dados foram fornecidos pela companhia que opera a estação.

Tabela 6- Parâmetros do Efluente

PARÂMETROS	EFLUENTE
Temperatura (°C)	21,7 ± 4,7
DBO (mg/L)	10,7 ± 3,0
DQO (mg/L)	106,3 ± 5,3
Fósforo Total - P (mg/L)	6,1 ± 2,0
Sólidos Suspensos (mg/L)	41,0 ± 9,9
Nitrogênio - NH ₄ (mg/L)	13,25 ± 6,5
Nitrogênio - NO ⁻² (mg/L)	0,2 ± 0,1
Nitrogênio - NO ⁻³ (mg/L)	6,9 ± 0,2
Nitrogênio (mg/L)	50,0 ± 9,8
Alcalinidade (mg/L CaCO ₃)	200,6 ± 66,3
PH	7,3 ± 7,3

O outro meio utilizado na etapa 3 foi utilizado o meio de cultura WC, utilizado para algas verde-amarelas (GUILLARD; LORENZEN, 1972, apud DERNER, 2006). O WC foi autoclavado em temperatura constante de 120° C. Na Tabela 7 foi apresentada a composição do meio WC.

Tabela 7 - Composição do meio de cultura WC.

Reagentes	Solução-estoque (g 100mL ⁻¹)	Meio de cultura
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36,8	1mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37,0	1mL
Na ₂ HCO ₃	12,6	1mL
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	11,4	1mL
NaNO ₃	85,0	1mL
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	21,2	1mL
Solução de Ferro	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) Na ₃ EDTA = 4,36 FeCl ₃ ·H ₂ O = 3,15	1mL
Solução micronutrientes MnCl ₂ ·4H ₂ O = 0,18 Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O = 0,006 H ₃ BO ₃ = 1,0	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) CuSO ₄ ·5H ₂ O = 0,01 ZnSO ₄ ·7H ₂ O = 0,022 CoCl ₂ ·H ₂ O = 0,01	1mL
Solução vitaminas	(g 1000mL ⁻¹ de água destilada) Tiamina HCl = 0,1 Biotina = 0,0005	1mL
Água destilada		1000mL

Fonte: Modificado de GUILLARD & LORENZEN, 1972.

4.4 Avaliação do Crescimento

Para quantificar a densidade celular, diariamente, de cada unidade experimental, foi coletada uma amostra da cultura através de seringas com volume de 20 ml. A contagem de células foi realizada em microscópio com auxílio de câmara de Neubauer. Foi avaliada densidade celular máxima (DCM), tempo de cultivo, produtividade (P) e número de duplicações por dia (k) (Derner, 2006).

4.5 Cálculos realizados

Para determinar a produtividade, a massa seca foi calculada no início de cada experimento e a cada dois dias após seu início. Amostras foram coletadas, filtradas e secas em estufa bacteriológica, conforme Arredondo-Vega e oltolina. A produtividade em gramas por litro por dia (g L⁻¹ dia⁻¹) foi calculada a partir dos dados de massa seca final e do tempo de cultivo.

A produtividade volumétrica dos cultivos foi calculada em gramas por litro por dia (peso seco), empregando a seguinte equação:

$$(1) \quad P = ((X_t - X_0) / (t - t_0))$$

Onde:

X_0 – concentração celular inicial do cultivo – (g/L)

X_t – máxima concentração celular obtida no cultivo – (g/L)

t_0 – tempo inicial – (dias)

t – tempo transcorrido desde o início do cultivo até ser alcançada a t (dias).

A velocidade de crescimento celular das microalgas (K) foi calculada por Stein (1973), conforme demonstrada na equação:

$$(2) \quad K = \frac{3,322}{\Delta t} * \log \frac{X_0}{X}$$

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);
Xo: concentração final (mg.L-1);
log: logaritmo base 10.

4.6 Determinação de nutrientes

A determinação de nutrientes foi realizada até o 8º dia de experimento baseado em bibliografias:

4.6.1 Determinação do fosfato

Esta análise é intitulada vanadomolibdofosfórico (APHA, 2005; VOGEL, 2002). O processo ocorre em duas etapas: a transformação do fósforo em ortofosfato e na segunda a reação de calorimetria. O ortofosfato reage com o molibdato de amônio e de tartarato de potássio e antimônio, em condições ácidas, para formar um complexo. Este complexo é reduzido com ácido ascórbico para formar um complexo azul que absorve a luz a 880 nm. A absorbância é proporcional à concentração de ortofosfato na amostra.

4.6.2 Determinação de nitrito

O nitrito (redução de nitrato mais nitrito inicial) é então determinada por diazotação, amina aromática, também chamada de componente diazo é transformada em um componente de diazônio, com sulfanilamida, seguido de acoplamento com N - (1 - naftil) etilenodiamina , dicloridrato . O corante solúvel em água resultante tem uma cor magenta o qual é lida a 520 nm (APHA, 2005).

4.6.3 Determinação de amônia

Este método é baseado na reação de Berthelot. A amônia reage com fenol alcalino, e de hipoclorito de sódio para formar indofenol azul. O nitroprussiato de sódio é adicionado para aumentar a sensibilidade. A absorbância do produto da reação é medida a 630 nm, e é diretamente proporcional à concentração do amoníaco original na amostra (APHA, 2005).

4.6.4 Determinação de nitrato

A determinação do nitrato conta com o kit da marca alfakit, nitraver, o qual é composto de cádmio.

A tabela 8 resume os métodos utilizados para determinação dos nutrientes citados a cima.

Tabela 8 - Parâmetros e métodos utilizados para análise dos cultivos de *Chlorella vulgaris*

Parâmetros Físicos – Químicos	Métodos
Nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	Método Colorimétrico de Nessler
Nitrogênio na forma de nitrito (N-NO ₂ -)	Método Colorimétrico de Alfanaftilamina
Nitrogênio na forma de nitrato (N-NO ₃ -)	Método Colorimétrico com kite
Ortofosfato (PO ₄)	Método Colorimétrico de Molibdênio

Fonte: APHA/AWWA/WEF (2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Etapa 1

Foi obtida a cepa de *Chlorellas vulgaris* com a diluição seriada a qual foi utilizada nas duas etapas seguintes.

5.2 Etapa 2

A etapa 2 foi finalizado no 14° dia de cultivo, quando observou que poderia estar ocorrendo à evaporação do mesmo, devido ao baixo volume de cultura. Nesse período, o pH mostrou-se semelhante nas três unidades de cultivo. Houve um aumento gradativo atingindo uma média de pico das três unidades de $10,76 \pm 0,05$ no 5° dia. Esse aumento do pH é referente a atividade fotossintética (HARUM, 2010). Após ocorreu uma oscilação nas unidades: *Chlorococcales* ($9,4 \pm 0,05$ e $9,21 \pm 0,05$), *Chlorella vulgaris* ($9,25 \pm 0,05$ e $9,72 \pm 0,05$) e *Desmodesmus* ($8,38 \pm 0,05$ e $9,25 \pm 0,05$). Na figura 10 foi apresentado o comportamento do pH nas 3 unidades da etapa.

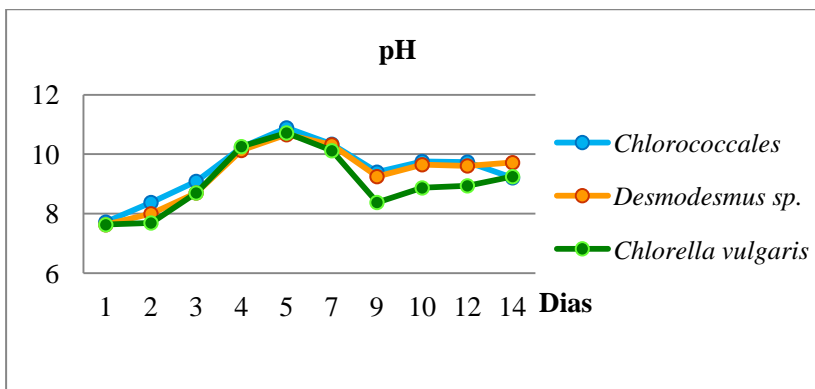


Figura 10 - pH das culturas ao longo do cultivo.

O crescimento das microalgas é indicado na figura 11 através da concentração de biomassa presente no efluente doméstico. Segundo Kliphuis como atingiu um pH acima do normal 7,5, *Chlorella vulgaris* por representar uma "microalga selvagem" que consegue se sobressair em condições extremas (LIU, 2008), obtendo a máxima de 2,22 g/l, enquanto *Desmodesmus sp.* 1,28 g/l e *Chlorococcales* 1,40 g/l.

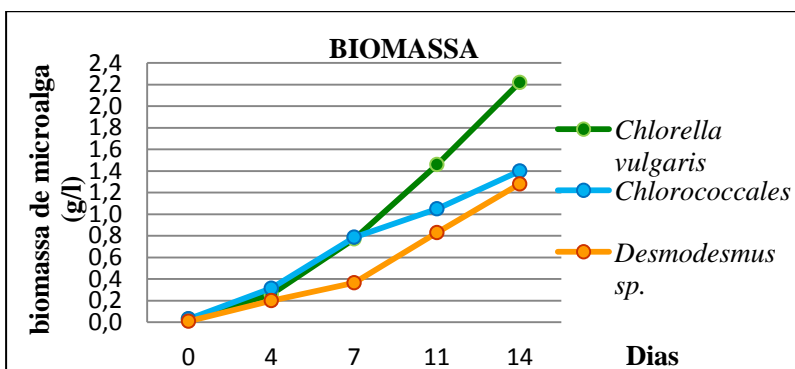


Figura 11 - Biomassa de microalgas ao longo do cultivo

Chlorella vulgaris apresentaram $160 \text{ mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$, *Desmodesmus sp.* $90 \text{ mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$ e *Chlorococcales* $100 \text{ mg.L}^{-1}\text{d}^{-1}$ de produtividade. Os valores de velocidade de crescimento foram identificados os maiores na *Desmodesmus sp.* $0,50 \text{ divisões. dia}^{-1}$. Na tabela 9 foram apresentados valores de biomassa, produtividade e velocidade de crescimento.

Tabela 9 - Valores de velocidades de crescimento (K), produtividade (P) e biomassa.

UNIDADES	Biomassa		P (mg.l ⁻¹ .d ⁻¹)	K divisões. dia ⁻¹
	(g/l)			
<i>Desmodesmus sp.</i>	0,009 I*	1,280F*	90	0,51
<i>Chlorococcales</i>	0,032I*	1,400 F*	100	0,39
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,032I*	2,220F*	160	0,44

I* início
F* fim

Assim como a biomassa, densidade celular, apresentada na figura 10, mostrou maior número de células de *Chlorella vulgaris*, atingindo um total de 4340×10^4 células/l, enquanto *Desmodesmus sp.* obteve 436×10^4 células/l e *Chlorococcales* 3340×10^4 células/l. Na figura 12 foi apresentado o gráfico da densidade celular da etapa 2.

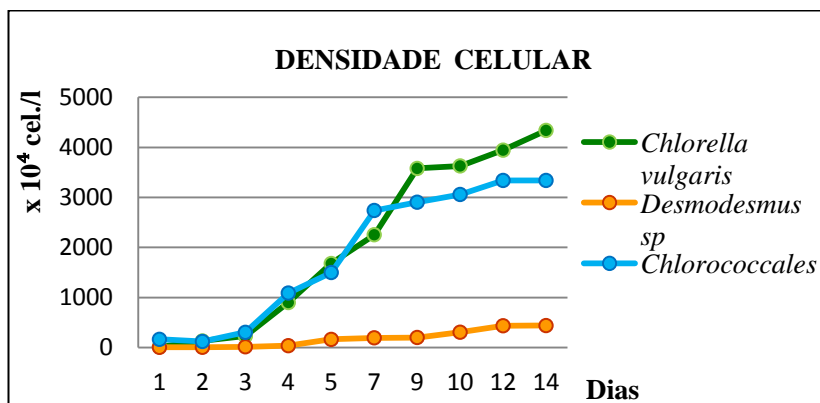


Figura 12 - Densidade celular da etapa 2.

Com esses indícios foi escolhida a *Chlorella vulgaris* para o experimento principal.

5.3 Etapa 3

A DCM atingiu a fase estacionária e apresentou comportamento semelhante para as duas unidades, sendo que *Chlorella vulgaris* cultivada no efluente como meio alternativo obteve uma densidade maior (5.200×10^4). (figura 13).

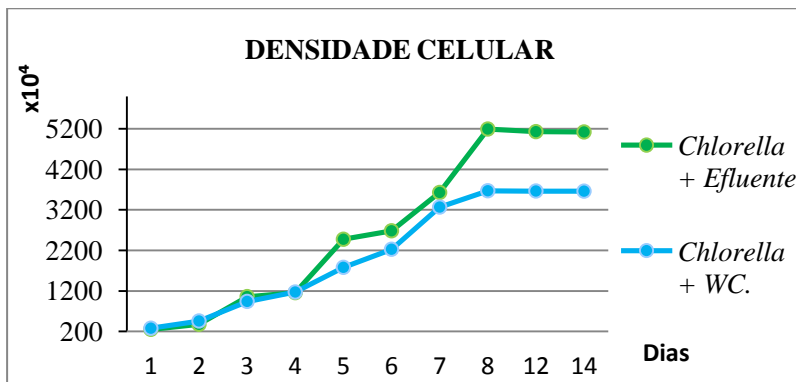


Figura 13 – Densidade celular da etapa 3

O pH apontou semelhança ao experimento na escolha da microalga. Na unidade com apenas efluente houve o aparecimento de microalgas no 7º dia. *Chlorella vulgaris* no efluente doméstico como meio alternativo mostra uma densidade celular ligeiramente maior no efluente do que no meio sintético, devido a maior disponibilidade de nutrientes (SAULLI, 2012). O mesmo ocorreu com a produtividade, velocidade de crescimento e biomassa; *Chlorella vulgaris* obteve valores maiores para produtividade e velocidade de crescimento como apresentado na tabela 10.

Tabela 10 - Velocidades de crescimento (K) e produtividade (P).

UNIDADES	Biomassa (g/L)	P (mg.l ⁻¹ d ⁻¹)	K divisões.dia ⁻¹
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	0,0475I* 1,701F*	118	0,369
<i>Chlorella vulgaris</i> + WC	0,0375I* 0,740F*	50	0,307

I* início

F* fim

A biomassa atingiu a fase estacionária para os dois tratamentos: *Chlorella vulgaris* no efluente doméstico e *Chlorella vulgaris* no meio sintético WC.

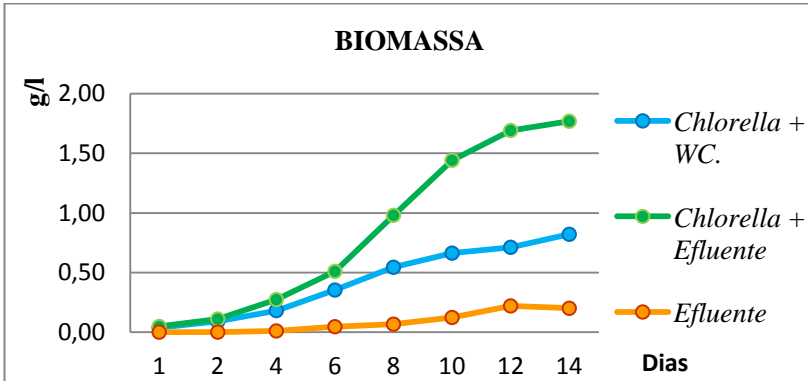


Figura 13 – Biomassa da etapa 3

5.3.1 Remoção de nutrientes

No 5º dia de experimento todos os nutrientes determinados (nitrito, amônia, nitrato e fostato) foram removidos. Em outras bibliografias a remoção não foi tão eficiente atingindo entre 70% e 90% segundo Delebarry (2012) no efluente da suinocultura. Acredita-se que tenha relação ao baixo valor inicial encontrado.

A unidade que continha apenas efluente doméstico clorado, denominado controle, também ocorreu à remoção dos nutrientes citados acima. Pode estar relacionado ao aparecimento de microalgas no meio a partir do 5º dia de experimento.

Nas figuras (14), (15), (16), (17) foi mostrado o comportamento dos nutrientes ao longo do tempo nos 3 tratamentos da etapa 3.

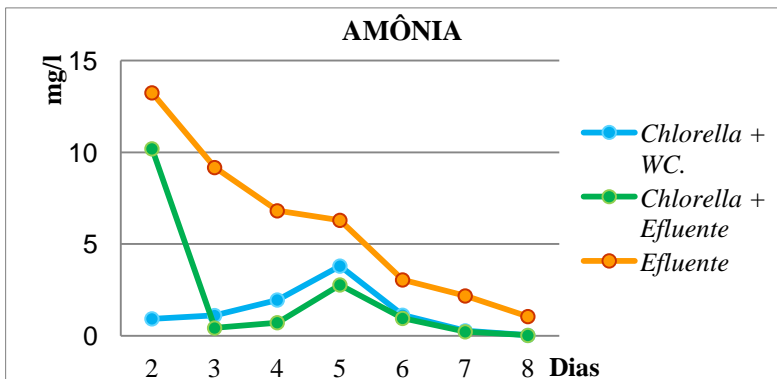


Figura 14 - Comportamento da amônia na etapa 3.

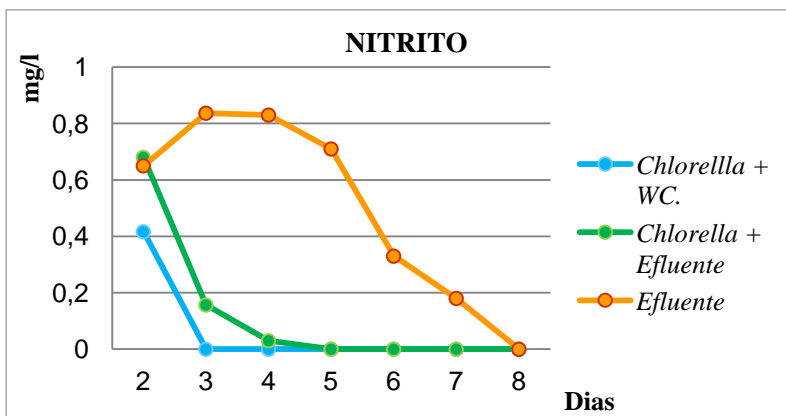


Figura 15 – Comportamento do nitrito na etapa 3.

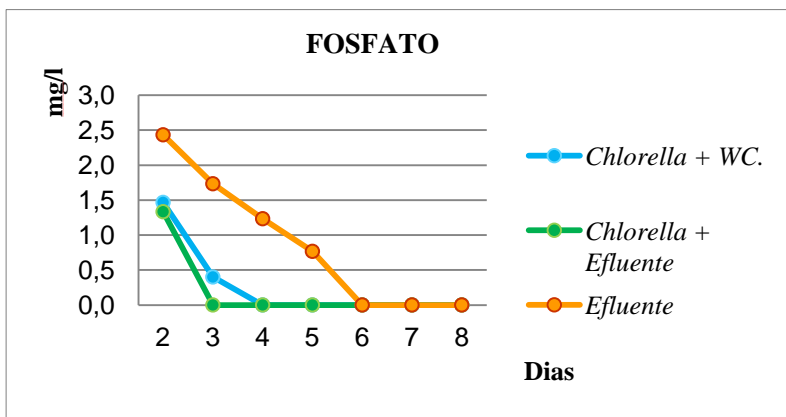


Figura 16 – Comportamento do nitrato na etapa 3.

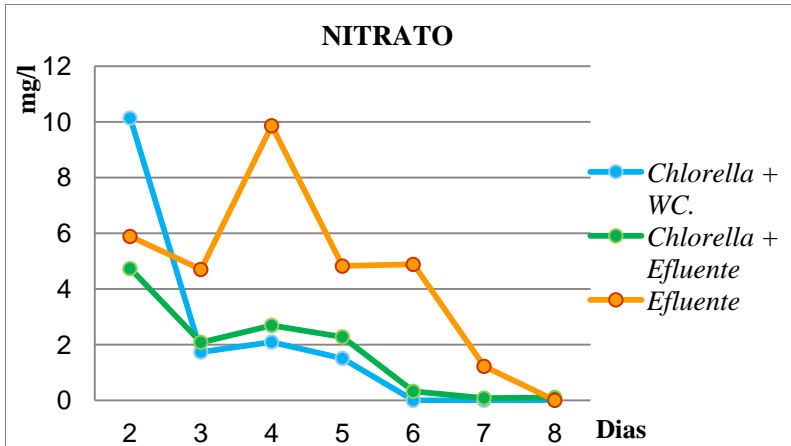


Figura 17 – Comportamento do ortofosfato na etapa 3

6 CONCLUSÃO

O efluente doméstico pode ser uma boa alternativa para produção de *Chlorella vulgaris*. Estas apresentaram ganho de biomassa maior que o meio sintético e assimilaram 100% do ortofosfato, nitrato, nitrito e amônia melhorando as características químicas para o posterior reuso ou descarte do efluente.

No teste para escolha da microalga conclui-se que além da *Chlorella vulgaris* outras espécies de microalgas também se adaptam ao efluente doméstico.

Em vista dos experimentos realizados são sugeridos outros testes para complementar ampliar o estudo de microalgas como: testar o cultivo de microalgas com efluente doméstico ao longo das estações, considerando as variações do efluente não pontual e sim ao longo do tempo; testar o cultivo de *Chlorella vulgaris* com outros efluentes como o industrial, seguimento metal mecânico, já previsto em algumas bibliografias; analisar a composição da biomassa desses cultivos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J. et al. **Microalgas: cultivo e aplicaciones**. España: Universidade da Coruña, p. 210 (Monografías n.26), 1995.

ANA, Agência Nacional das Águas. **Cuidando das Águas: Soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos**. Brasília: ANA, 2011.

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.

ARREDONDO-VEGA, B. O. **Crecimiento autotrófico y mixotrófico de la microalga marina *Porphyridium cruentum***. Tese (Doutorado) - Facultad de Farmácia, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, p. 138, 1995.

ASHA, Parmar; NIRAJ, Kumar; ASHOK Pandey et al. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. **Bioresource Technology**, p.10163–10172, 2011.

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

BERTOLDI, Fabiano C.; SANT'ANNA, Ernani; OLIVEIRA, Jorge L. **Revisão: biotecnologia de microalgas**. B.CEPPA, Curitiba, v. 26, n. 1, 2008.

BEWICKE, Dhyana; POTTER, Beverly A. et al. **Chlorella: the emerald food**. Berkeley, CA: Rlonin Pub., 1984.

BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p. 21-26, 1993.

BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, p. 477, 1988.

BRENNAN, Liam; OWENDE, Philip. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of

biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. Irlanda. v.14, p. 557–577, 2010.

CARBALLO-CARDENAS EC; TUAN, PM Janssen M; WIJFFELS, RH. Vitamin E (alpha- tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. **Biomolecular Engineering**. P. 20: 139–47. 2003.

CHSTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances** , p25:294– 306, 2007.

COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor & Francis, 1999.

COLLIER, J.L., S.K. Herbert, D.C. Fork, and A.R. Grossman. 1994. Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. **Photosynthesis Research**, p.42:173-183, 1994.

COX, P.A; BANACK, S.A; MURCH, S.J. et al. **Diverse taxa of cyanobacteria produce L²-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, p.102 (14):5074–8, 2005.

DE PAUW, N.; VAN VAERENBERGH, E. Microalgal wastewater treatment systems: Potentials and limits. In: Ghetta, P.F. (Ed.), 12 **Phytodepuration and the Employment of the Biomass Produced**. Centro Ric. Produz, Animalia, Reggio Emilia, Italy, p. 211–287, 1983.

DELABARY, Gabriela S. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos suínos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DERNER, Roberto Bianchini; OHSE, Silvana; VILLELA, Maurício et al., **Microalgas, produtos e aplicações** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, p. 1959, 2006.

EPPLEY, R.W. The growth and Culture of diatoms. In: WERNER, D. (Ed). **The biology of diatoms**. Berkeley: University of California, p.24-64 (Botanical Monographs, v.13), 1977.

ERICA, M.T. SalonOvations' Day Spa Techniques. **Cengage Learning**, p.137, 1996.

FALKOWSKI, PG; RAVEN, JA. **Aquatic photosynthesis**. London: Blackwater Science, p. 375, 1997.

FUNDAÇÃO NACIONAL. **Manual do saneamento: orientações técnicas**. FUNASA. Brasília, 2004.

GARCIA-CASAL, MN; RAMIREZ, J; LEETS I, Pereira AC; QUIROGA MF. Antioxidant capacity, polyphenol content and iron bioavailability from algae (*Ulva* sp., *Sargassum* sp. and *Porphyra* sp.) in human subjects. **British Journal of Nutrition**. P.101:79–85. 2009.

GALINDRO, Bruno M. **Análise técnica e avaliação do ciclo de vida de culturas de produção de microalgas para biodiesel** (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GODOS, Id; BLANCO, S; GARCIA-ENCINA PA, BECARES, E et al. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. **Bioresource Technol**, p.100: 4332–9. 2009.

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

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.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds). **Culture of marine invertebrate animals**. New York: Plenum, p.29-60. 1975.

HARUN, Razif; SINGH, Manjinder; FORDE, Gareth M. et al. **Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Austrália, v.14, p.1037–1047, 2010.

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

HELLENBUST, J.A. Light: plants. In: KINNE, O. (Ed). Marine ecology. **A comprehensive integrated treatise on life in oceans and coastal waters**. London: Wiley Interscience, p.124-158. 1970.

HOEK, C. van den et al. **Algae: an introduction to phycology**. London: Cambridge University, p.623, 1995.

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.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87, p.38-46, 2010.

ILLMAN, A. M., SCRAGG, AH, SHALES, SW. Increase in chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 27:631–5. 2000.

KANNO, Toshihiro. **Chlorella Vulgaris and Chlorella Vulgaris Extract**. Orem: Woodland Publishing, p. 11, 2005.

KHOTIMCHENKO, Sv; YAKOVLEVA, IM **Lipid composition of the red alga Tichocarpus crinitus exposed to different levels of photon irradiance**. Phytochemistry, p.73 - 79, 2005.

KIERSZENBAUM, Abraham L. **Histologia e Biologia celular: Uma introdução à patologia**. 3ª ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2012.

KITAYA, Y; AZUMA, H; KIYOTA, M. **Effects of Temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*.** Adv Space Res. 2005. 35:1584–1588.

KONG, Q-x; LI, L; MARTINEZ, B; CHEN, P et al. Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. **Appl Biochem Biotechnol** , p. 60:9–18, 2010.

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, YK. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, p.13:307–15, 2001.

LEVIN, D.B.; LAWRENCE, P.; MURRY, L. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. **Int. J. Hydrogen Energy**, p. 29, 173–185. 2004.

LI, X, XU, H, WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella Protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol Bioeng**, p. 98(4):764–71. 2007.

LI, X.; HU, HY; GAN, K. et al. **The effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on growth, nutrient uptake and accumulation of lipids in a water microalgae *Scenedesmus* sp.** Bioresour Tecno, p. 5494 – 5500, 2010.

LIU, Zy; ZHOU, B.C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresour Tecno**, p. 717- 722, 2008.

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., p. 608, 2004.

MASOJIDEK, J.; TORZILLO, G. **Mass cultivation of fresh water microalgae.** Encyclopedia

- METCALF, L.; EDDY, H.P. **Waste Water Engineering**, second ed. McGraw-Hill, San Francisco.1980.
- MIAO, X; WU, Q. High yield bio oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **J Biotechnol**, 110:85-93. 2004.
- MOLINA G. 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.
- MORI, F.; ERATA, M. et al. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae in the NIES-Collection.: **Microbiol. Cult. Coll.**, p. 45-55p. 2002.
- MULBRY, W.; KONDRAD, S.; PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. **Bioresource Technol**, p. 99:8137-42. 2008.
- MUNOZ, R; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Res**, p. 40:2799–815, 2008.
- MURPHY, V.; HUGHES, H.; MCLOUGHLIN P. Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. *Chemosphere* 70:112, p. 8–34, 2008.
- NAKANISHI, K. Chlorophyll rich and salt resistant chlorella. European Patent 1,142,985; 2001.
- NPDEAS. Disponível em: <<http://www.npdeas.blogspot.com/>>. Acesso em: 10 nov. 2013.
- OHSE, S; DERNER, R. B; OZÓRIO, R. O. et al. 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 production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, p.12:499–506. 2000.

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.

PARK, JBK; CRAGGS, RJ.; SHILTON; AN. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technol**, p.06-158. 2010.

PITTMAN, JK; DEAN, AP; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technol*; in press. of **Ecology** ,p. 2226–35, 2008.

PROSAB. Nutrientes de esgoto sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. **Valuable products from biotechnology of microalgae**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004;65:635–48.

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.

PUOTINEN, C.J. Herbs for detoxification. McGraw-Hill Professional; p. 25, 1999.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7th ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 906, 2001.

RAWAT, I.; RANJITH, Kumar et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, p. 3411-3424, 2011.

- RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture:** biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p. 566, 2004.
- RONSON, S.; DUBINSKY, Z. **Mass production of microalgae.** Experientia Basel, v.38, p.36-39, 1982.
- ROGERS, Kara. **Fungi, Algae and Protists.** New York : Britannica Educational Pub. in association with Rosen Educational Services, 2005.
- SAKAI, N; SAKAMOTO, Y; KISHIMOTO N, et al. Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Convers Manage**, p. 36(6–9):693–6, 1995.
- SAKURAI, H., MASUKAWA, H., Promoting R&D in photobiological hydrogen production utilizing mariculture-raised cyanobacteria. **Mar. Biotechnol**, v.2, p. 128- 145, 2007.
- SÉSTON BIOTECNOLOGIA. Disponível em: <<http://www.seston.com.br>>. Acesso em: 12 nov. 2013.
- SHELEF, G.; SOEDER, C. J. **Algal Biomass: production and use.** Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p 852, 1980.
- SHU, Chin-Hang; TSAI, Chieh-Chung.; LIAO, WH. et al. **Enhancing high quality oil accumulation and carbon dioxide fixation by a mixed culture of *Chlorella sp.* and *Saccharomyces cerevisiae*.** J Chem Tecno Biotechnol, p. 601 – 607, 2013.
- SILVA FILHO, Germano. **Microbiologia: manual de aulas práticas.** Editora da UFSC, 2007.
- SINGH, S.; KATE, B.; BANERJEE, U.C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. Crit. Rev. **Biotechnol**, p. 25, 73–95, 2005.
- SPOLAORE, P; JOANNIS- AASSANC; DURAN. E; ISAMBERTA. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. P.101:87–96, 2006.

SUALI, Emma; SARBATLY, Rosalam. **Conversion of microalgae to biofuel**. Renewable and Sustainable Energy Review. Malasia. v. 16, p. 4316– 4342, 2012.

TAMAGNINI, P.; LEITAO, E.; OLIVEIRA, P. et al. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. **FEMS Microbiol. Rev.** p. 31, 692–720, 2007.

TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: iotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p.178-214, 2004.

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.

VON SPERLING, Marcos. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**, v.01. Minas Gerais: ABES, 1995.

WIDJAJA, A; CHIEN, C.; JU, Y.H. **Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris***. J Taiwan Inst Chem Eng, p. 40:13–20, 2009.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, p. 8(6):487–502. 1996.

YONGMANITCHAI, W.; WARD, O.P. **Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid**. Phytochemistry, v.9, n.30, p.2963-2967, 1991.

8. APÊNDICE

Anexo 1 - Parâmetros da unidade 1 (*Chlorococcales*) na escolha da microalga para o experimento principal.

Parâmetros/ Dias	1	2	3	4	5	7	8	9	12	14
pH	7,72	8,38	9,09	10,89	10,23	10,34	9,4	9,76	9,74	9,21
Turbidez (NTU)	11,87	29,46	47,13	108,36	162,29	471,30	697,14	769,22	618,69	533,34
Densidade celular	165 x 10 ⁴	122x 10 ⁴	305x 10 ⁴	1090x 10 ⁴	1500x 10 ⁴	2740x 10 ⁴	2905x 10 ⁴	3060x 10 ⁴	3340x 10 ⁴	3340x 10 ⁴
Biomassa (mg/l)	0,032	-	-	-	0,314	0,788	-	-	1,050	1,400

Anexo 2 - Parâmetros da unidade 2 (*Chlorella vulgaris*) na escolha da microalga para o experimento principal.

Parâmetros/ Dias	1	2	3	4	5	7	8	9	12	14
pH	7,63	8	8,7	10,13	10,66	10,32	9,25	9,65	9,61	9,72
Turbidez (NTU)	13,67	22,23	37,72	93,02	182,4	488,4	717,4	822,3	447,4	822,36
Densidade celular	16 x 10 ⁴	133 x 10 ⁴	230x 10 ⁴	900x 10 ⁴	1680x 10 ⁴	2255x 10 ⁴	3630x 10 ⁴	3580x 10 ⁴	3945x 10 ⁴	4340x 10 ⁴
Biomassa(mg/l)	0,032	-	-	-	0,257	0,771	-	-	1,460	2,220

Anexo 3 - Parâmetros da unidade 3 (*Desmodesmus*) na escolha da microalga para o experimento principal.

Parâmetros/ Dias	1	2	3	4	5	7	8	9	12	14
pH	7,63	7,69	8,7	9,36	10,1	8,6	8,38	8,87	8,94	9,25
Turbidez (NTU)	11,6	33,3	37,7	63,1	78,7	153,9	294,9	352,2	465,7	686,3
Densidade celular	14 x 10 ⁴	12 x 10 ⁴	16 x 10 ⁴	38 x 10 ⁴	164 x 10 ⁴	195 x 10 ⁴	77 x 10 ⁴	307 x 10 ⁴	436 x 10 ⁴	438 x 10 ⁴
Biomassa (mg/l)	0,009	-	-	-	0,200	0,365	-	-	0,830	1,280

Anexo 4 - Parâmetros do experimento principal da *Chlorella vulgaris* no efluente doméstico.

Parâmetros / Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pH	8,28 5	10,1	10,8	11,0	11,2	11,0	10,7	10,0	9,8	9,5	9,4	9,4	8,7	8,6
Turbidez (NTU)	22,6 8	51,1	87,5	118,1	173, 0	249,3	391, 9	538, 1	583, 1	634,7	656, 3	725,0	749, 4	785,5
Densidade celular	250 x 10 ⁴	374 x 10 ⁴	1058 x 10 ⁴	1155 x 10 ⁴	2473 x 10 ⁴	2681 x 10 ⁴	3627 x 10 ⁴	-	-	5192 x 10 ⁴	-	5148 x 10 ⁴	-	5148 x 10 ⁴
Biomassa (mg/l)	0,04 7	0,110	-	0,273	-	0,510	-	0,75 0	-	0,843	-	0,922	-	0,920

Anexo 5 - Parâmetros do experimento principal da *Chlorella vulgaris* no meio de cultura sintético.

Parâmetros/ Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pH	9,48	10,3 4	10,8 2	10,9 3	11,0 4	10,9 8	10,73	9,80	9,63	9,57	9,39	8,44	8,42	8,14
Turbidez (NTU)	17,7	38,4	63,7	88,3	137, 3	200, 2	303,5 8	423,5 9	473,8 2	530,8 8	560,1 7	629,4 7	640,	672
Densidade celular	278 x 10 ⁴	456 x 10 ⁴	940 x 10 ⁴	1171 x 10 ⁴	1780 x 10 ⁴	2226 x 10 ⁴	3266 x 10 ⁴	-	-	3655 x 10 ⁴	-	3650 x 10 ⁴	-	3655 x 10 ⁴
Biomassa (mg/l)	0,03 7	0,09 0	-	0,18 0	-	0,35 3	-	0,544	-	0,672	-	0,680	-	0,68 1

Anexo 6 - Triplicata da análise de amônia das microalgas avaliadas no experimento principal. (mg. L-1)

UNIDADES/ DIAS	2	3	4	5	6	7	10
<i>Chlorella vulgaris</i> + wc.	1,16	1,38	1,53	3,16	0,67	0,25	0,02
<i>Chlorella vulgaris</i> + wc.	1,06	1,32	2,52	3,61	1,48	0,27	0,03
<i>Chlorella vulgaris</i> + wc.	0,58	0,64	1,83	4,65	1,24	0,32	0,04
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	10,27	0,33	0,84	2,35	1,17	0,26	0,04
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	10,1	0,46	0,72	3,91	0,96	0,24	0,02
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	10,21	0,51	0,61	2,08	0,74	0,18	0,03
Efluente	11,39	9,05	7,3	6,81	3,5	2,12	1,16
Efluente	13,79	8,3	7,02	6,24	2,85	2,11	1,03
Efluente	14,55	10,17	6,13	5,85	2,81	2,31	0,98

Anexo 7 - Triplicata da análise de nitrito das microalgas avaliadas no experimento principal (mg. L-1).

UNIDADES/ DIAS	2	3	4	5	6	7	10
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	0,37	0	0	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	0,42	0	0	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	0,46	0	0	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	0,56	0,19	0	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	0,82	0,19	0,08	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	0,66	0,09	0,01	0	0	0	0
Efluente	0,61	0,85	0,71	0,66	0,3	0,19	0
Efluente	0,64	0,74	0,9	0,71	0,33	0,17	0
Efluente	0,7	0,92	0,88	0,76	0,36	0,18	0

Anexo 8 - Triplicata da análise de nitrato das microalgas avaliadas no experimento principal (mg. L-1).

UNIDADES/ DIAS	2	3	4	5	6	7	10
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	10,00	1,60	1,99	1,47	0,00	0,00	0,00
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	10,28	1,95	1,99	1,57	0,00	0,00	0,00
<i>Chlorella vulgaris</i> + w.c.	10,12	1,64	2,30	1,48	0,00	0,00	0,00
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	4,44	2,62	2,72	2,58	0,42	0,08	0,01
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	4,26	1,22	2,55	1,70	0,42	0,17	0,21
<i>Chlorella vulgaris</i> + efluente	5,49	2,41	2,79	2,55	0,14	0,00	0,10
Efluente	6,81	5,45	7,83	4,98	4,82	0,87	0,00
Efluente	5,24	4,26	8,948	4,55	4,997	0,63	0,00
Efluente	5,59	4,38	12,79	4,93	4,82	2,16	0,00

