

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

BIORREMOÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E METAIS
PESADOS (Fe, Mn, Cu, Zn) DO EFLUENTE HIDROPÔNICO,
ATRAVÉS DO USO DE *Chlorella vulgaris*

FABIANA DA SILVA

Florianópolis, Janeiro/ 2006

Bióloga FABIANA DA SILVA

**BIORREMOÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E METAIS PESADOS
(Fe, Mn, Cu, Zn) DO EFLUENTE HIDROPÔNICO, ATRAVÉS DO USO
DE *Chlorella vulgaris***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luís Barcelos
Co-orientador: João Bosco Rozas Rodrigues

FLORIANÓPOLIS
2006

Silva, Fabiana

Biorremocão de Nitrogênio, Fósforo e Metais Pesados (Fe, Mn, Cu, Zn) do efluente hidropônico, através do uso de *Chlorella vulgaris*/ Fabiana da Silva. –

Florianópolis, 2006.

85f. :il., tabs.

Orientador: Jorge Luís Barcelos de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

Bibliografia: f.61-70.

1.Agricultura Urbana e Periurbana – 2. Tratamento de efluente - 3. Biorremediação - 4. Ficologia. I. Título.

FABIANA DA SILVA

BIORREMOÇÃO DE NITOGÊNIO, FÓSFORO E METAIS PESADOS (Fe, Mn, Cu, Zn) DO
EFLUENTE HIROPÔNICO, ATRAVÉS DO USO DE *Chlorella vulgaris*

Dissertação aprovada em 31/01/2006, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora:

Dr. Jorge L. Barcelos Oliveira
Orientador

Dr. João Bosco Rozas Rodrigues
Co-Orientador

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Antonio Augusto A. Pereira
Presidente

Dr. João Bosco R. Rodrigues
Membro

Dr. César Assis Butignol
Membro

Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna
Membro

Prof. Luiz Carlos Pinheiro Machado Filho
Coordenador do PG Agroecossistemas

Florianópolis, 31 de janeiro de 2006.

“A capacidade máxima de um homem e de uma mulher não deve ser medida quando ele e ela se encontram em momentos de conforto e conveniência, mas nos momentos de desafios e controvérsias.”

Martin Luther King

**A todos os seres que fazem minha existência valer
apena:**

Aos meus maravilhosos pais, amigos, companheiros e mestres, Getúlio e Ivani pela sólida e maleável base estrutural que me alicerça em toda minha caminhada e por toda a sabedoria, confiança e amor que dedicam aos seus filhos e netos.

Aos meus lindos e queridos irmãos e sobrinhos: Raquel, Batista, Amábile, Alexandre e Pâmela pelo carinho e sabedoria.

Aos meus novos, lindos e eternos amores, Eduardo e bebezinha Yurahá que está a caminho.

Aos queridíssimos amigos, pelo amor, admiração e aprendizados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, auxiliaram no presente trabalho, em especial:

Ao querido colega Fabiano Bertoldi pela parceria, confiança, atenção, esmero, orientação e extrema dedicação à parte experimental do trabalho, sobre tudo os interessantes e importantes conselhos, discussões, correções e direcionamentos intelectuais.

Ao Prof. Dr. Jorge Luís Barcelos de Oliveira pela orientação, conselhos e amizade.

Ao Prof. Dr. João Bosco Rozas Rodrigues pela co-orientação tanto na parte experimental como na construção textual, pela atenção, disponibilidade e confiança.

Aos queridos estagiários do projeto Petrobrás e amigos Gabriel Junqueira e Maurício Vilela por toda a dedicação, a atenção, o comprometimento e a responsabilidade com as atividades experimentais envolvidas no presente trabalho.

Aos estagiários do Laboratórios de Agricultura Irrigada e Hidroponia (LabHidro) pela atenção e colaboração.

A Petrobrás pelo financiamento do projeto e a Capes pela bolsa, que viabilizaram a concretização deste mestrado.

Aos grandes mestres, como o Prof. Renato D'Agostini, Paul Richard Miller, César Butignol e Maria José Reis, que durante o período de mestrado, contribuíram na retirada das películas dos meus olhos, desmistificando paradigmas.

A todos os professores e profissionais que se dedicam pela melhoria da qualidade da troca de conhecimentos.

Ao Professor e amigo Ubert pelos sábios conselhos, apoio e amizade oferecida durante esta caminhada.

À grande amiga e excelentíssima secretária do Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, Janete pela extrema dedicação, competência, paciência e amizade, comigo e com os demais colegas.

Aos profissionais da limpeza e funcionários pela dedicação diária a todos os alunos e professores, fazendo com que tenhamos ambientes limpos e agradáveis.

À profissional de limpeza, Janete, do Departamento de Engenharia de Alimentos, pela extrema dedicação e responsabilidade com a esterilização do laboratório de Biotecnologia de Alimentos, no período experimental deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela estrutura disponibilizada, tal como os Laboratórios de Agricultura Irrigada e Hidroponia (LabHidro), de Biotecnologia e de Informática da Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Aos grandes mestres água, terra, ar e fogo por me ensinarem a observar com esmero e com o coração todos os movimentos de todos os seres do Planeta.

À queridíssima, amorosa e fiel companheira Cristal, minha cachorra do coração que fielmente me acompanhou em grande parte desse processo de construção intelectual e pessoal.

Aos lindos e incríveis e inesquecíveis colegas e parceiros de mestrado pela dedicação, sensibilidade, harmonia e companheirismo: Jean, Cristhiane, Martinha, Luciana, Maurício, Wilton bioncão, Matheus, Dário, Charle, Cadu e Ferro.

Aos amigos Jean, Wilian, Maurício, Patrícia, Luciana, Daniel, Tchesco, Martinha, Wilton, Charle, Daniel Habibi e Cadu pela ajuda técnica, financeira, emocional, espiritual.

Às queridas amigas e companheiras Cristina Baudalf e Eliza Griza por toda a força, carinho, amizade, paciência e companheirismo.

Aos queridos colegas e companheiros de moradia Anne Claire, Pery, Luciana e Cristal pelos momentos maravilhosos vividos na Casa Amarela.

As flores e os cravos mais lindos e perfumados do grande jardim agroflorestal que tanto me inspiram: Melissa, Tina, tia Elisa, Yanina Micaela, Norma Patrícia, Mateus, Anne Claire, Vicent, Pery, Luciana, César Butignol, Alisson, Ademir Cazela, Luciano Amapá, Eduardo, Cleyton, Letícia e Adriana.

As companheiras, amadas e irmãs Lu, Marthinha e Claire pelos sábios conselhos e por todos os olhares carinhosos, críticos, medicinais e terapêuticos dedicados a mim e a minha dissertação.

Aos queridos amigos e companheiros Paulo e Celina por toda a confiança, a dedicação e grande força que foi de extrema importância para esta caminhada.

À querida amiga Melissa pelo especial carinho, disposição e paciências oferecidas ao longo do trabalho e nas correções finais.

A todos os amigos que não foram mencionados, mas que indefinidamente foram essenciais nesta trajetória.

Às microalgas, tais como, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina máxima* e *S. platensis* por alimentar a humanidade desde as civilizações mais antigas como os Astecas (México) e os Kanembous, nativos de Kanem, do norte de Tschad, na África e, sobretudo a grande importância como biorremediadoras ambientais.

E à consciência Cósmica, ao Jín Shín Jyustsu, à Jane Guedes, aos ensinamentos dos Índios, a Física Quântica e ao Universo por me ensinarem a buscar o meu caminho e a minha verdade dentro de mim.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	07
SUMÁRIO.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE SÍMBOLOS.....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1.OBJETIVOS.....	21
1.1.1. Geral.....	21
1.1.2. Específicos.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRAFIA.....	25
3.1. Agricultura Periurbana, Intra e Periurbana.....	25
3.1.1. Conceitos e Importância.....	27
3.1.2. O Ambiente: Aspectos Ecológicos e Biodiversidade.....	28
3.1.3. Segurança Alimentar e Nutrição.....	29
3.2. Hidroponia.....	31
3.3. Aspectos Ambientais e Efluentes.....	35
3.3.1. Alternativas de Tratamento de Efluente: Biorremocão de Nutrientes Através do Uso de Macrófitas e Microalgas.....	40
3.4. Microalgas.....	43

	11
3.4.1. Classe Chlorophyceae.....	45
3.4.2. Caracterização da Microalga <i>C. vulgaris</i>	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1. Abordagem.....	48
4.2. Experimento.....	49
4.2.1. Local.....	49
4.2.2. Efluente Hidropônico.....	49
4.2.3. Cultura Estoque.....	50
4.2.4. Preparo do Inóculo.....	50
4.2.5. Unidades Experimentais.....	51
4.2.6. Parâmetros Determinados.....	52
4.2.7. Análise Estatística.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
5.1. Densidade Celular.....	54
5.2. pH.....	56
5.3. Concentração e Biorremocão de N-NH ₃ , N-NO ₃ , N-NO ₂ , P-Total e Metais pesados (Fe, Mn, Cu, Zn).....	57
6. CONCLUSÕES.....	61
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
8. BIBLIOGRAFIA.....	63
9. ANEXOS.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de nutrientes (mg.L^{-1}) para o cultivo hidropônico de hortaliças folhosas proposta por Furlani (1998).....	34
Tabela 2: Características Físicas e Químicas do efluente hidropônico (EH). As concentrações dos nutrientes são propostas por Furlani (1998).....	49
Tabela 3: Composição do meio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) em mg.L^{-1} , segundo Cañizares-Villanueva <i>et al.</i> (2000).....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma explicativo dos materiais e métodos utilizados no experimento.....	48
Figura 2 - Crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> no tratamento controle BBM, durante 7 dias de experimento, janeiro de 2005.....	51
Figura 3 - Crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> no tratamento EH, durante 7 dias de experimento, janeiro de 2005.....	52
Figura 4 - Curva de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> no controle BBM e no efluente hidropônico no decorrer de sete dias, em Janeiro de 2005. Os valores médios do gráfico encontram-se no Anexo 5.....	54
Figura 5 - Variação do pH no BBM e EH durante o crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> nos sete dias de cultivo. Os valores de pH são encontrados no Anexo 10.....	56
Figura 6 - Valores médios da concentração de Fósforo Total e Nitrogênio Inorgânico (N-NH ₃ , N-NO ₃ , e N-NO ₂), ao longo de sete dias. Os valores expressos encontram-se no Anexo 6.....	57
Figura 7 - Eficiência da biorremediação (%) do Fósforo e do Nitrogênio Inorgânico do efluente hidropônico pela <i>Chlorella vulgaris</i> , no decorrer dos sete dias de cultivo. Os valores expressos encontram-se no Anexo 7.....	58
Figura 8 – Eficiência da biorremoção (%) de metais (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico através do uso da <i>Chlorella vulgaris</i> , ao longo de sete dias de cultivo. Os valores expressos encontram-se no Anexo 8.....	59
Figura 9 – Eficiência da biorremoção (%) de metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico através do uso da <i>Chlorella vulgaris</i> , no decorrer dos sete dias de crescimento celular. Os valores expressos encontram-se no Anexo 9.....	59

LISTA DE SÍMBOLOS E DE TERMOS

$\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (unidades (mol) por metro quadrado pro segundo) = LUX - Iluminação

DV - Desvio padrão

cell.mL^{-1} (células por mililitros) - Densidade celular

Cu - Cobre

Fe - Ferro

Ficorreemoção (ficorremediação) - É a remoção de substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, através do uso de algas e microalgas

g.1000L^{-1} - Concentração

Lag - Fase de indução

Log - Fase exponencial

Mn - Manganês

N - Nitrogênio

N-NH₃ - Nitrogênio Amôniacal Total

N-NO₂ - Nitrito

N-NO₃ - Nitrato

NO₂ - Óxido nitroso

NO₃ - Óxido nítrico

P - Fósforo

PET - Polietileno tereftalato

P-Total - Fósforo total

v/v (volume por volume)– Volume do inóculo da microalga

Zn – Zinco

RESUMO

A hidroponia é uma técnica de cultivo protegido, a qual é muito utilizada em todo o mundo e no Brasil, onde há uma crescente tendência a este tipo de cultivo de hortaliças, principalmente nas áreas urbanas e periurbanas. O efluente hidropônico contém altas quantidades de Fósforo e de Nitrogênio inorgânicos e é descartado mensalmente em grandes quantidades no esgoto, e no solo contaminando o lençol freático e os corpos d'água. A presença no ambiente aquático de compostos ricos em Nitrogênio e Fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn), geram sérios problemas de eutrofização e de intoxicação nos seres vivos, degradando a qualidade da água. O presente trabalho avaliou a eficiência de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* e seu potencial de biorremocão de Fósforo, de Nitrogênio, de Fe, de Mn, de Cu e de Zn do efluente hidropônico produzido no Laboratório de Hidroponia da UFSC. O experimento foi realizado em laboratório sob condições assépticas e a microalga foi cultivada a ± 20 °C com luz contínua $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ no meio controle Bold's Basal Medium e no efluente hidropônico, durante 7 dias. Houve um incremento na densidade celular inicial da *C. vulgaris* de $2,5 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ para ambos tratamentos no início do ciclo e atingindo no final a densidade celular de $10,6 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ para o cultivo controle $5,7 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ para o cultivo em efluente hidropônico. Obteve-se uma remoção em % de 82,2 de amônia, 80,5 de N-NO₃, 84,20 de N-NO₂, 51,9 de P-Total, 88,22 de Fe, 79,54 de Mn, 58,2 de Cu e 60,91 de Zn do efluente hidropônico. Neste estudo, pode-se concluir que a ficobiorremediação através da *C. vulgaris* é uma boa alternativa de reciclagem para efluente hidropônico, pois a microalga se adaptou eficientemente ao respectivo efluente, possibilitando a efetividade da biorremocão de Nitrogênio, Fósforo, Fe, Mn, Cu e Zn.

Palavras chave: Agricultura Periurbana e Urbana, tratamento de efluentes, biorremediação, ficologia.

ABSTRACT

The hydropony is a technique of protected cultivation, which is very used all over the world and in Brazil there is a growing tendency of this type of vegetables cultivation, mainly in the urban and periurban areas. This is considered that São Paulo, that is the largest producer of hydropony, now possesses 200 hectares of cultivated area approximately, producing 48.000.000 L/month of effluent on average. The hydroponic effluent contains high amounts of inorganic Phosphorus and Nitrogen and it is usually discarded monthly in great amounts in the sewer, and in the soil contaminating the sheet and the aquatic environment. The presence in the aquatic environment of composed rich in Nitrogen and Phosphorus and heavy metals (Fe, Mn, Cu and Zn), that are nutritious sources for the algae, generate serious eutrofization and intoxication problems in the alive beings, degrading the quality of the water and in some occasions causing problems for the alive beings' health. The present work evaluated the growth efficiency of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the potential of bioremediation thought of Phosphorus, of Nitrogen, of Fe, of Mn, of Cu and of Zn resnation of the hydroponic effluent produced in Laboratory of Hidroponia of the UFSC. The experiment was accomplished in laboratory under aseptic conditions and the microalgae was cultivated 2 °C with light continuous $150 \text{ mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in the half controls Bold's Basal Medium and in the hydroponic effluent, during 7 days. There was an increase in the cellular density of the *C. vulgaris* of $2,5 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$ for both treatments in the beginning of the cycle and reaching in the end the cellular density of $10,6 \times 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$ for the cultivation to control BBM, $5,7 \times 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$ for the cultivation in EH. It was obtained a removal in % of 82,18 of N-NH₄ 80,5 of N-NO₃, 84,18 of N-NO₂, 51,90 of total-P, 88,22 of Fe, 79,54 of Mn, 58,2 of Cu and 60,91 of Zn of the hydroponic effluent. In this study, it can be ended that the ficobioremediation through to *C. vulgaris* is a good recycling alternative for hydroponic effluent, because the microalgae adapted itself efficiently to the respective effluent, making possible the effectiveness of the bioremediation of Nitrogen, Phosphorus, Fe, Mn, Cu and Zn.

Palavras chave: Urban and periurban agriculture, treatment of effluents, biorremediation, ficology.

1. INTRODUÇÃO

A hidroponia é uma técnica de cultivo protegido, na qual o solo é substituído por uma solução aquosa, que contém os elementos minerais essenciais aos vegetais. A produção hidropônica está concentrada aproximadamente 80% na cultura da alface e os 20% restantes nas demais culturas comerciais com destaque em rúcula, agrião, tomate, melão, hortelã e manjeriço (FURLANI *et al.*, 1999).

Segundo Pompêo (1996), Martinez (1997), Rodrigues (2002), este tipo de cultivo proporciona desenvolvimento uniforme e adequado estado fitossanitário das plantas, exige menos trabalho e, ainda, reduz o desperdício de água e nutrientes. Para esses autores, produzir por hidroponia, diminui a incidência de doenças nas plantas e, por conseguinte, a necessidade de uso de agrotóxicos. A ausência de contato da planta com a terra pode evitar doenças por nematóides e outros organismos fitopatogênicos existentes no solo. Além das vantagens morfofisiológicas e fitossanitárias, em ambientes em que a terra disponível não é agriculturável, visto que o clima é desfavorável e a água está pouco acessível, a atividade hidropônica torna-se uma alternativa viável para o cultivo destas hortaliças.

A hidroponia tem permitido, ainda, a produção de verduras fora de época, reduzindo riscos com adversidades climáticas. Portanto, com potencial de produção todo ano é interessante identificar e analisar as conseqüências que podem ser inconvenientes para os agroecossistemas.

Para a produção hidropônica o sistema mais utilizado no Brasil é o NFT (Técnica de fluxo laminar de nutrientes), que consiste em fazer circular nas calhas de cultivo os nutrientes contidos na solução nutritiva (Anexos 1 e 2). Esse processo, segundo Furlani *et al.* (1999), por ser um sistema fechado, ou seja, com recirculação, pode causar contaminação (desenvolvimento de fitopatógenos) e desbalanceamento na solução nutritiva, indicando a necessidade de descarte da

solução a cada 14 dias em média. Esses efluentes são compostos de nutrientes como: nitratos, nitritos, amônia, fosfatos, sulfato, Fe, Mn, Cu, Zn entre outros. Ressalte-se que o grande volume de elementos químicos, quando descartados no ambiente sem tratamento prévio, poderão causar problemas sanitários¹ e ambientais, como a eutrofização dos ambientes aquáticos.

As grandes concentrações de nitrogênio e fósforo, usados nos adubos e fertilizantes, constituem um tipo muito comum de poluição da água. As enxurradas transportam para os rios os fosfatos e nitratos. Outra forma desses nutrientes chegarem aos mananciais de água é pela infiltração no solo atingindo o lençol freático e posteriormente os corpos de água. Com o aumento de nutrientes no meio aquático as plantas e o fitoplâncton ficam bem nutridos, os quais se multiplicam (especialmente algas) e absorvem o oxigênio da água ocorrendo assim o anacrobismo do meio. Por sua vez, a falta de oxigênio provoca a morte de muitas plantas e animais que, ao se decomporem, causam odor e sabor desagradável da água, aumentando a poluição. Além destes fatos, muitos outros são causadores da poluição dos rios (VON SPERLING, 1998).

Além desta questão, é importante ressaltar a presença de metais pesados na água e nos efluentes, que dependendo do local em que são descartados, contribuem para aumentar a poluição dos corpos de água, conseqüentemente, podendo causar grandes problemas para a vida aquática, por serem acumulativos na cadeia trófica e produzirem efeitos tóxicos e mudanças teratogênicas em plantas, em animais e em seres humanos, sendo também, que permanecem nos sedimentos e são liberados na água receptora final, como é colocado por Canizares-Villanueva e Travieso (1991).

Dentre estes problemas causados pelo excesso destes nutrientes, nota-se também que o excesso de óxido nitroso (NO₂) e óxido nítrico (NO₃) na água e nos alimentos podem causar metemoglobinemia em crianças.

Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os organismos, desde que presentes em baixas concentrações (SALGADO, 1996). Do contrário, como é ressaltado por Trevosrs; Stratdon e Gadd (1986) e Salgado (1996), podem afetar o sistema biológico, causando ao homem e aos animais domésticos câncer, dores de cabeça fortíssimas, queda dos dentes, perda visão, diarréia sanguinolenta, anúria, alteração dos processos bioquímicos, das organelas e das membranas celulares de todos os sistemas vivos, dentre tantos outros efeitos tóxicos para a saúde pública e dos ecossistemas terrestres e aquáticos.

¹ Este tema será retomado na Revisão Bibliográfica.

No Brasil, a produção hidropônica se expande, ampliando também as preocupações com o destino dos seus efluentes. Segundo dados da Estação experimental de Hidroponia de Charqueadas (São Paulo) (STAFF, 1998), o Estado de São Paulo tinha até 1998 um número próximo de 500 produtores hidropônicos, formando uma área equivalente a 25 ha, capaz de produzir aproximadamente 6×10^6 L/mês de efluente hidropônico. Atualmente, estima-se que esta área tenha se ampliado para aproximadamente 200 ha, produzindo em média 48×10^6 L/mês de efluente. Em 1998, a produção dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Mato Grosso somados, ultrapassava 30 ha de área cultivada com hidroponia, produzindo em média 7.200.000 L/mês de efluente hidropônico. Hoje, estes estados possuem aproximadamente 100 ha de área cultivada, produzindo em média 20×10^6 L/mês de efluente².

Esses números demonstram a necessidade de uma gestão ambiental adequada para os efluentes hidropônicos, impulsionando pesquisas e a utilização de métodos que visem mitigar possíveis problemas ambientais decorrentes do uso da hidroponia. Anaga e Abu (1996) e Olguín *et al.* (2000), citam a microalga *Chlorella vulgaris* como biorremediadora no tratamento de efluentes.

As microalgas são microorganismos pertencentes ao Phylum Chlorophyta, que contém clorofila e outros pigmentos fotossintéticos sendo capazes de realizar fotossíntese. Assim, no grupo incluem-se os organismos de dois tipos celulares distintos: cianobactérias, com estrutura celular procariota e as restantes microalgas de estrutura celular eucariota (LEE, 1989). As microalgas tais como, *Spirulina maxima* e a *Spirulina platensis* (classe Cyanophyceae, ordem Oscillatoriales, família Cyanophyceae) (Hoek *et al.*, 1995), a *Chlorella ssp.*, *C. vulgaris* e *C. pyrenoidosa* (classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales e família Oocystaceae) (Hoek *et al.*, 1995), o *Scenedesmus quadricauda* (classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales, família Scenedesmaceae) (Hoek *et al.*, 1995), dentre outras microalgas, são utilizadas como complemento dietético e alimentar de alta qualidade para a humanidade e para os animais (WALDENSTEDT *et al.*, 2003). Para Richmond (2004), outra utilidade das microalgas de grande importância é a depuração de águas residuais, a partir de cultivos intensivos destes organismos. Também possuem a capacidade de remover metais pesados, pois incorporam esses na parede celular (YAN & PAN, 2002)).

² Informações obtidas oralmente através do professor Pedro Roberto Furlani, pesquisador do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) em 20 de outubro de 2004.

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Agricultura Irrigada e Hidroponia (LabHidro) e de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

1.1. OBJETIVOS:

1.1.1. Geral

O presente estudo teve como objetivo verificar a potencialidade da microalga *Chlorella vulgaris* na remoção de Nitrogênio, Fósforo e metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico com intuito de reduzir a quantidade de nutrientes presentes neste efluente.

1.1.2. Específicos

- a) Avaliar a densidade celular e pH dos meios de cultivos durante o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*;
- b) Determinar a remoção de N, P e de metais pesados (Fe, Cu, Mn e Zn) do efluente ao final do crescimento da microalga;
- c) Comparar o crescimento da microalga no meio de cultivo Bold Basal Medium (STOKES, P.M,1973) com o efluente hidropônico.

2. JUSTIFICATIVA

A Hidroponia é utilizada em praticamente todo o mundo. No Brasil, a utilização desse tipo de cultivo apresenta-se crescente, especialmente em áreas urbanas e periurbanas³ (FAO, 1996). De acordo com estudos realizados pela Food Agriculture Organization (FAO), nessas áreas, a hidroponia torna-se atividade importante à medida que permite o cultivo de hortaliças em situações inviáveis para a agricultura com solo. Note-se que a demanda por produção agrícola e novas tecnologias gera, de outro lado, uma carga de poluição ambiental crescente. Nesse sentido, ao mesmo tempo em que a hidroponia permite facilidades na produção de hortaliças, pode acabar gerando alguns transtornos ambientais e problemas de saúde pública, tais como acelerada eutrofização de ambientes aquáticos, efeitos tóxicos nas plantas, nos animais e na humanidade pela liberação de efluentes na natureza.

Essas preocupações estão contidas nas novas regulamentações governamentais. O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na Resolução de 22 de setembro de 2003, Processo nº 02000.002378/2002-43, 6º reunião do GT revisão da Resolução 020/86, artigo 21 e Resolução 357/2005, estipulam o valor máximo permitido de 20 mg.L⁻¹ de Nitrogênio Amoniacoal Total, 4 mg.L⁻¹ de Fe, 1 mg.L⁻¹ de Mn, 1 mg.L⁻¹ de Cu e 5 mg.L⁻¹ de Zn, contidos em qualquer efluente. O Ministério Público de Santa Catarina, com o decreto Nº 14.250, de 05 de junho de 1981, regulamenta o dispositivos da lei nº 5.793, de 15 de outubro de 1980, artigo 19, que estabelece os valores de 1,0 mg.L⁻¹ de P-total e de 10,0 mg.L⁻¹ de N-total contido nos efluentes.

Contudo, as concentrações de 174 mg.L⁻¹ de N-total e de 39 mg.L⁻¹ de P-Total contidas no efluente hidropônico do LabHidro/UFSC extrapolam os valores máximos permitidos pelo CONAMA e pelo Ministério Público de Santa Catarina. No caso dos metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn), as concentrações 1,949 mg.L⁻¹, 0,259 mg.L⁻¹, 0,04 mg.L⁻¹ e 0,11 mg.L⁻¹, respectivamente, contidas no efluente hidropônico não ultrapassam os valores máximos permitidos pelo

³ Segundo a FAO (1996) a agricultura periurbana refere-se a unidade agrícola próximo da cidade que opera intensiva, semi ou completamente a produção comercial para cultivar horticultura, criar galinha, criar gado e obter leite e ovos.

CONAMA. No entanto, é relevante o fato de serem acumulativos na cadeia trófica, nos sedimentos dos corpos de água e nos órgãos dos seres vivos, demonstrando, assim, a necessidade de estudos que permitam a remoção dos nutrientes presentes no efluente hidropônico antes que esse seja lançado no ambiente.

Considerando que grande parte dos agricultores, que utilizam hidroponia, descarta os efluentes produzidos diretamente no ambiente (esgoto, solos), ou seja, sem um tratamento prévio, torna-se importante encontrar métodos eficazes e satisfatórios no tratamento desses efluentes. Segundo Alvarado e Fasanaro (1980), diferentes estratégias poderão ser utilizadas no tratamento de resíduos domésticos, industriais e agrícolas. Entre elas: lagoas de estabilização de lodos (atividades biológicas de bactérias); e a biorremoção, através de macrófitas aquáticas como as taboas, os aguapés, os juncos, as lemnas ou mesmo com macro e microalgas.

Estudos realizados por Beltrão (1992), Anaga e Abu (1996), Olguín (2000) Rodrigues (2000), Méndez (2003), demonstram que as microalgas podem ser utilizadas na biorremediação (biorremoção) de resíduos industriais, de metais pesados, de fertilizantes, de resíduos de criação de suínos e efluentes de indústrias de suco de laranja. Dentre as microalgas que apresentam grande potencial biorremediador destaca-se a espécie microscópica e unicelular *Chlorella vulgaris* (Anexo 3). Essa microalga apresenta altos teores de proteínas, ácidos graxos, β -carotenóides, sais minerais, clorofila a e b, vitaminas do complexo B, entre outras substâncias, podendo ser utilizada, portanto, como complemento alimentar e componente farmacológico.

As microalgas, como a *C. vulgaris* demandam principalmente nutrientes como fósforo e nitrogênio para o seu crescimento, desenvolvendo-se facilmente em qualquer modalidade de efluente. A solução nutritiva utilizada na hidroponia, como no efluente, possui na sua composição N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, B, Mo e Cl, constituindo-se em uma fonte nutritiva adequada para microalgas biorremediadoras. Os elementos presentes nos efluentes hidropônicos são semelhantes aos nutrientes encontrados na composição dos meios de cultura comerciais para a microalga *Chlorella* spp., reforçando o potencial e a preferência pela *C. vulgaris* para a biorremoção de nutrientes e de depuração dos efluentes.

Outras estratégias que visam dar um destino adequado aos efluentes hidropônicos seriam: (1) o reaproveitamento mediante a análise química para a correção de cada elemento, um processo de filtração de materiais em suspensão e o tratamento para a eliminação de patógenos; (2) utilização da solução para fertirrigação eventual ou cultivo hidropônico em sistemas abertos com utilização de substratos. Entretanto, ambas alternativas ainda se apresentam pouco

aplicáveis, visto que: (1) as análises químicas necessárias possuem custo muito elevado, onerando os gastos para a produção; (2) os estudos com fertirrigação são bastante deficientes, necessitando de maiores pesquisas; (3) a utilização da solução em sistemas abertos requer maior conhecimento do substrato utilizado.

Frente essas colocações, considera-se que a reutilização da solução nutritiva no cultivo de vegetais fanerógamos (macrófitas aquáticas) e vegetais criptógamos (microalgas), com elevada resposta em produção, mostram-se capazes de reduzir o teor de nutrientes deste efluente, diminuindo danos ao ambiente e à saúde pública. A biomassa algal adquirida após a remoção de nutrientes, poderá ser utilizada pelos agricultores como complemento alimentar na ração animal, como fertilizante nos cultivos, podendo ser utilizada como renda complementar, através da comercialização dessa biomassa para as indústrias farmacêuticas, de cosméticos e alimentares.

Considere-se, ainda, que a hidroponia associada ao uso de microalgas, ao proporcionar outra fonte econômica aos agricultores, insere-se numa perspectiva de desenvolvimento rural voltado aos agricultores familiares urbanos e periurbanos. Ao mesmo tempo, essa alternativa vem ao encontro de um adequado gerenciamento dos efluentes hidropônicos, reduzindo sobremaneira seus impactos ambientais. O trabalho proposto está inserido em dois temas referenciais do Programa de Mestrado em Agroecossistemas, a saber: Desenvolvimento Rural e Atores Sociais; e Desempenho Ambiental.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo abordará a agricultura urbana, intra e periurbana, sua relação com a hidroponia, com o ambiente (aspectos ecológicos e biodiversidade), com a segurança alimentar e nutrição, como também as fundamentais contribuições dessas agriculturas para todos os envolvidos direta e indiretamente. O que é hidroponia, como que ela funciona como é gerado o efluente e o que esse pode causar para o ambiente e para a saúde pública; aspectos ambientais e efluentes (eutrofização, N, P, efeitos tóxicos e metais pesados); alternativas de tratamentos de efluentes: biorremocão de nutrientes através do uso de macrófitas aquáticas e de microalgas; microalgas, classe Chlorophyceae e caracterização da microalga *C. vulgaris*.

3.1. AGRICULTURA URBANA, INTRA E PERIURBANA

A expansão das cidades é acompanhada pela necessidade crescente de fornecer alimentos às famílias que nelas residem. Ao mesmo tempo, os índices de pobreza das populações urbanas têm aumentado, assim como a dificuldade ao acesso à alimentação básica (MACHADO, 2001). Para esse autor, a prática da agricultura urbana, que compreende o exercício de diversas atividades relacionadas à produção de alimentos e conservação dos recursos naturais dentro dos centros urbanos ou em suas respectivas periferias, surge como estratégia efetiva de fornecimento de alimentos, de geração de empregos, além de contribuir para a segurança alimentar e melhoria da nutrição dos habitantes das cidades.

Note-se que essa modalidade de atividade agrícola promove mudanças benéficas na estrutura social, econômica e ambiental do local onde ela se instala (MONGEOT, 2000), uma vez que ela gera renda às populações atingidas, reduz impactos ambientais, diminui áreas propensas ao armazenamento de entulhos, e conseqüentemente, proliferação de mosquitos, ratos, baratas e de doenças.

Entretanto, sua concretização depende fundamentalmente de decisões políticas e da participação dos governantes (MACHADO, 2001). Segundo Machado (2001) e Mongeot (2000), o apoio oficial ao estabelecimento da agricultura urbana por parte de organizações governamentais ou não-governamentais e por parte de agências internacionais⁴ tem surgido em várias partes do mundo.

As expressões agricultura urbana (agricultura intra-urbana) e periurbana já são adotadas pelas agências das Nações Unidas, tais como United Nations Development Programme (UNDP) (SMITH *et al.*, 1996) e FAO (1996) e referem-se à utilização de pequenas superfícies situadas dentro das cidades ou em suas respectivas periferias para a produção agrícola e criação de pequenos animais, destinados ao consumo próprio ou à venda em mercados locais (FAO, 1999).

Em estimativa feita em 1996, relatou-se o envolvimento de cerca de 800 milhões de pessoas com a agricultura urbana em todo o mundo (SMITH *et al.*, 1996). Essa atividade permite, portanto, disponibilizar e aproveitar espaços domésticos e públicos para a produção de alimentos, plantas medicinais, ornamentais, hidroponia e criação de pequenos animais. As metodologias de trabalho e o planejamento da produção devem, contudo, ser elaborados com bases técnicas. Pesquisadores e extensionistas são fundamentais nesse processo, auxiliando na estruturação e no funcionamento dos sistemas de produção fornecendo informações por meio de cursos e treinamentos, adaptando e desenvolvendo tecnologias e viabilizando alternativas de produção de acordo com as exigências de cada local (MACHADO, 2001).

O conceito de agricultura urbana é ampliado quando são analisadas as contribuições de sua prática para o ambiente e para a saúde humana (DIAS, 2000), pois se constitui em importante forma de suprir os sistemas de alimentação urbanos, relacionando-se com a segurança alimentar e o desenvolvimento da biodiversidade e proporcionando melhor aproveitamento dos espaços, contribuindo, dessa forma, para o manejo adequado dos recursos de solo e da água (MOUGEOT, 2000).

Machado (2001), ressalta que a saúde está diretamente ligada às condições alimentares e ambientais e, no contexto de comunidades da periferia, aos níveis de doença que se intensificam diante da pouca disponibilidade de alimentos e da baixa qualidade desses, assim como, da vulnerabilidade das pessoas expostas a agentes externos.

⁴ As agências internacionais têm disponibilizado montantes consideráveis de recursos financeiros para projetos nessa linha de pesquisa.

Dentre as contribuições ambientais da agricultura urbana, podem ser destacadas a diminuição do acúmulo de entulhos e a melhoria da qualidade da água, a reciclagem da parcela de lixo orgânico em compostos para fertilização dos solos e os recipientes, principalmente plásticos, o reaproveitamento desses para a produção de mudas e cultivo de algumas espécies. Ressalte-se ainda o valor estético de espaços verdes, a formação de microclimas, a preservação de doenças por meio de uma alimentação diversificada e o poder curativo das plantas medicinais. Todos esses são componentes da qualidade de vida proporcionada pela agricultura urbana (Dias, 2000).

Note-se que há certa tendência da população em se deslocar para os centros urbanos (BAKKER *et al.*, 2000). Conforme relata Dias (2000), na América Latina, América do Norte e Europa já são três quartos da população atual habitando em zonas urbanas. A própria ONU vem alertando para os níveis elevados de urbanização e sua relação direta com os níveis de pobreza e insegurança alimentar desde a Conferência Habitat II - Conferência das Nações Unidas sobre Assentamentos Urbanos (SMITH *et al.*, 1996).

Esses dados demonstram a necessidade de políticas públicas voltadas para o incentivo e a implementação da agricultura urbana, uma vez que essas podem favorecer e promover o desenvolvimento local das periferias de grandes cidades. Além disso, o redirecionamento dos objetivos da comunidade com ações participativas em todos processos de desenvolvimento permite oferecer opções de vida saudável para a população, gerando empregos e melhorias na qualidade de vida. A produção de alimentos de boa qualidade nutricional e sem agrotóxicos desenvolvida a custo relativamente baixo, pode contribuir, ainda, para aumentar a renda familiar.

3.1.1. Conceitos e Importância

Para a FAO (1996), a agricultura periurbana refere-se à unidade agrícola próximo da cidade que opera intensiva ou semi-intensiva na produção comercial para cultivar vegetais e outras horticulturas, criar galinhas e gados, e obter leite e ovos. A definição de agricultura urbana, segundo Mongeot (1999) e Machado (2001), refere-se à localização dos espaços dentro e ao redor das cidades ou áreas urbanas. Para esses autores, a área intra-urbana refere-se a todos os espaços dentro das cidades que podem ter algum tipo de atividade agrícola.

Segundo Machado (2001), esses locais podem ser áreas individuais ou coletivas ou, ainda, áreas públicas dentro e entre os contornos das cidades, incluindo as vias públicas, praças, parques e áreas ociosas como lotes e terrenos baldios. Esse autor, destaca que a área periurbana é mais

complexa quanto à definição de sua localização. Ela deve estar próxima à cidade e o limite pode variar de 10 a 90 km, dependendo do desenvolvimento da infra-estrutura de estradas e dos custos de transporte. A agricultura periurbana, por sua vizinhança com as áreas rurais, interfere na dinâmica da agricultura, podendo ocorrer a combinação do trabalho rural com o não-rural, variando conforme as necessidades da população local ou das famílias.

Muitas áreas que há pouco tempo eram consideradas rurais, hoje são classificadas como áreas de agricultura periurbana (MONGEOT, 1999 e MONGEOT, 2000). Ao mesmo tempo, a indústria e o comércio ocupam espaços até então destinados à agricultura, fazendo com que se agreguem problemas urbanos, como criminalidade, poluição, entre outros, aos espaços rurais, tornando essa realidade bastante complexa (MACHADO, 2001).

Segundo o mesmo autor, multiplicaram-se os problemas sociais, problemas da poluição do meio ambiente e principalmente das águas. O lixo e a violência passaram a fazer parte da rotina dessas áreas, existindo conflitos por terras, trabalho e principalmente por alimentos. É nesse contexto que a atividade agrícola periurbana passa a ser de fundamental importância nessas áreas, proporcionando maior equilíbrio social, proteção ambiental e relativa segurança alimentar, coadunando para o desenvolvimento mais equitativo e menos agressivo nesses espaços.

3.1.2. O ambiente: Aspectos ecológicos e biodiversidade

As agriculturas urbana, intra e periurbana modificam consideravelmente a performance ecológica das cidades, compondo, nesses espaços, ambientes para a produção de alimentos (MONGEOT, 1999). De acordo com Machado (2001), esses tipos de agricultura, permitem mitigar problemas ambientais, conservando o solo, minimizando o lixo nas cidades, promovendo a reciclagem de nutrientes, além de melhorar o manejo da água, da biodiversidade, do balanço de O₂ e CO₂ e da consciência dos cidadãos urbanos.

Outro ponto importante a se destacar em relação com o ambiente, é a limpeza de áreas que normalmente são destinadas ao acúmulo de lixo e entulhos (MACHADO, 2001). A limpeza dessas áreas e sua utilização para plantio e outras formas de produção proporcionam o aperfeiçoamento do ambiente local, diminuindo a proliferação de vetores das principais enfermidades e conseqüentemente controlando endemias e epidemias.

Muitas áreas urbanas se mostram impróprias para cultivos agrícolas, pois se encontram poluídas ou contaminadas por entulho e metais pesados. Nesses casos, recomenda-se que esses espaços sejam inicialmente ocupados por outro tipo de vegetação visando diminuir o impacto

nocivo das contaminações e proporcionar, em longo prazo, condições de uso (MONGEOT, 2000). Note-se que o adequado diagnóstico das condições de uso do solo em ambientes urbanos torna-se de fundamental importância.

Para Mongeot (2000), o planejamento urbano para a prática de agricultura necessita ser adequadamente elaborado, planejado e integrado, uma vez que a agricultura urbana não se resume apenas ao plantio de espécies destinadas à alimentação, mas a todos os aspectos ligados ao manejo da biodiversidade e ao meio ambiente. Ressalte-se ainda que a arborização, os jardins, as aves, os animais e as plantas ornamentais fazem parte do desenho urbano e se ligam à prática da agricultura urbana.

Dessa forma, todos os espaços da cidade podem constituir um contorno verde entre prédios, casas, vias públicas, praças, parques, encostas e alterar as condições climáticas locais, contribuindo para incrementar a umidade, reduzir a temperatura, melhorar o odor, capturar gases do ar poluído, proteger do vento e interceptar a radiação solar, criando lugares sombreados e protegidos (MONGEOT, 2000).

Machado (2001), ressalta que as agriculturas urbana, intra e periurbana, também podem ter efeito positivo na biodiversidade. Esses três ambientes são frequentemente ricos em espécies da flora e da fauna, tendo efeitos positivos também no desenvolvimento de práticas agrícolas sustentáveis, desde que estejam ligadas a todos os processos de manejo do ambiente, incluindo os fatores relacionados à ecologia e à biodiversidade.

3.1.3. Segurança Alimentar e Nutrição

Conforme Armar-Klemesu (2000), o conceito de segurança alimentar está nas agendas internacionais desde 1948, quando da Declaração Universal dos Direitos Humanos, afirmando que “todos têm direito a um padrão de vida adequado para a saúde e alimentação”. Em 1996, na Convenção Internacional sobre os direitos econômicos, sociais e culturais afirmou-se que “o homem tem o direito de se livrar da fome”. O direito à comida é, portanto, caracterizado como fundamental, mas a questão da fome continua sendo grave problema e traz sérias consequências à vida dos habitantes das cidades (DEELSTRA & GIRARDET, 2000).

As práticas agrícolas urbanas hoje são as mais variadas possíveis: produção de alimentos utilizando-se das técnicas da hidroponia ou da organoponia (hidroponia orgânica)⁵ em áreas com solos poluídos ou de aterro de construção civil, hortas caseiras, hortas coletivas, produção de vegetais em cercas que circundam as comunidades urbanas, produção em vasos, em pneus, em garrafas tipo “pet” (polietileno tereftalato) etc.

É importante ressaltar que a escala da produção urbana é geralmente subestimada. Em dados publicados recentemente, verifica-se que existem 200 milhões de novos habitantes urbanos com atividade em agricultura urbana, provendo alimentação para mais de 800 milhões de pessoas (ARMAR - KLEMESU, 2000). Nos dados de 1993, verifica-se que cerca de 15% a 20% da alimentação mundial, naquele ano, foi produzida em área urbana. Mougeot (1994), relata que 40% da população das cidades africanas e 50% das cidades latino-americanas estão envolvidas com a agricultura urbana.

Assim, a hidroponia tem adquirido popularidade como uma solução para os problemas de acesso à terra pelos agricultores urbanos, intra e periurbana. Agricultores urbanos no México, Peru e Cuba estão usando espaços menos convencionais para produção de alimentos, utilizando técnicas de hidroponia orgânica, chamada “organoponia”. O uso de defensivos alternativos tais como o nim (*Azadirachta indica*), soluções com fumo e pimenta e palhada do alho tem aumentado ultimamente. Outra prática que tem alcançado popularidade é o cultivo de plantas medicinais. O apoio de técnicos e médicos tem permitido o desenvolvimento de novos métodos de terapia e de tratamentos muito mais baratos e mais acessíveis para as populações de baixa renda.

Entre as principais contribuições da agricultura urbana, intra e periurbana, pode-se salientar três áreas fundamentais: bem-estar, meio ambiente e economia. Machado (2001); Mongeot (2000) e Armar-Klemesu (2000), destacam que, em termos de distribuição de alimentos, essas agriculturas são apoiadas pela comunidade e desenvolvem um sistema inovador de ligação entre o produtor urbano e o consumidor, ou seja, são criados espaços de comercialização que relacionam uma produção artesanal vinculada à demanda da comunidade e consumidores.

⁵ Os sistemas hidropônicos orgânicos, mecanicamente, não apresentam nenhuma diferença dos convencionais inorgânicos, a diferença está na solução de nutrientes. Esta, em vez de preparada através de sais minerais industrializados, é preparada a partir de dejetos de animais e resíduos vegetais e animais bio-digeridos em biodigestores e biofiltros.

Segundo esses autores, muitas vezes, as comunidades de produtores atingem um nível elevado de conhecimento e de recursos a ponto de processarem seus próprios produtos, criando também cooperativas e agroindústrias.

A agricultura urbana, intra e periurbana são importantes fontes de suprimentos dos sistemas de alimentação para as populações, podendo relacioná-la com a segurança alimentar e desenvolvimento da biodiversidade, uma vez que proporciona melhor aproveitamento dos espaços, manejo adequado dos recursos de solo e água, assim como às questões ambientais por promover a redução no acúmulo de lixo e melhorar a qualidade da água (ARMAR-KLEMESU, 2000). A formação de microclimas, a preservação de doenças por uma alimentação diversificada e pelo poder curativo das plantas medicinais, são componentes da qualidade de viver proporcionada pela prática da agricultura urbana, intra e periurbana (MACHADO, 2001).

Levando-se em conta que a hidroponia, de alguma forma, está inserida dentro desse contexto, a FAO (1996), tem demonstrado ser muito comum a utilização dessa técnica agrícola nas áreas urbanas, intra e periurbanas, uma vez que essa se mostra como um tipo de agricultura capaz de ser realizada em lugares onde, em determinadas situações, as condições ambientais são desfavoráveis para a agricultura com solo. Dessa forma, faz-se necessário entender o que é a hidroponia, como funciona o sistema de cultivo, qual é a formulação da solução nutritiva, que a posteriori se tornará em efluente hidropônico, sendo necessário ser descartado e se não gerenciado adequadamente, pode transformar-se em problemas ambientais e de saúde.

3.2. HIDROPONIA

O tema desta pesquisa é a biorredução de N e P do efluente hidropônico, neste item, abordar-se-á, o que é hidroponia, como que ela funciona, como é gerado o efluente e o que este efluente pode causar para o ambiente e para a saúde pública.

A hidroponia, termo derivado de duas palavras de origem grega – *hydro*, que significa água, e *ponos*, que significa trabalho, sendo utilizado pela primeira vez em 1930, pelo Dr. W.F. Gericke, na Universidade da Califórnia. Este pesquisador foi quem popularizou o cultivo em ausência de solo (JONES Jr., 1982 *apud* MARY, 1998).

A primeira referência em literatura foi uma observação de John Woodward que, em 1699, cultivou menta em alguns “tipos de água”. Entretanto, a utilização da técnica para o cultivo doméstico ou para fins comerciais começou em 1938, através dos trabalhos de Gericke que, durante toda a década, pesquisou o assunto. Durante a Segunda Guerra Mundial o governo norte-

americano adotou a técnica em bases militares, cultivando vegetais para alimentação de suas tropas. Os países, como Japão e Israel, adotaram posteriormente a alternativa de cultivo (MARY, 1998).

Em 1699, John Woodward, um inglês, professor de medicina, derrubou a teoria da água de Van Helmont. Woodward cultivou, 150 anos antes de surgir à técnica da hidroponia, plantas sem terra. Esse autor, instalou, em recipientes de mesmo tamanho, plantas de menta em diferentes tipos de água: de chuva, de rio, de enxurrada e esgoto diluído. Observou que onde a quantidade de material sólido era maior, a produtividade da menta foi melhor. Concluiu então, que não era da água que as plantas se nutriam, mas sim do material sólido do solo. Com esse ensaio refutou as considerações de Van Helmont e de Aristóteles. Segundo Mary (1998), é a primeira citação, em literatura, sobre cultivo hidropônico.

Surgiram então as bases da química moderna e as contribuições de Justus Von Liebig e de De Saussure, com relação à assimilação de CO₂ (JONES, 1983 *apud* MARY, 1998).

A hidroponia está se desenvolvendo rapidamente como meio de produção vegetal, principalmente de hortaliças sob cultivo protegido. Sendo que, essa é uma técnica de cultivo protegido, no qual o solo é substituído por uma solução aquosa, que contém apenas elementos minerais essenciais aos vegetais (FURLANI *et al.*, 1999).

Ela está distribuída em todo o mundo, segundo Mary (1998), a prática da hidroponia no continente americano tem como alicerce o cultivo de hortaliças e plantas ornamentais, como cravo e rosas. Na África existem grandes empresas com explorações do cultivo hidropônico voltadas para alimentação de seus funcionários. Na Rodésia se tem obtido, tomates, batatas e variadas hortaliças por hidroponia e com pleno sucesso. De acordo com Martinez (1997), na Inglaterra, cultiva-se na maior parte das instalações hidropônicas flores, tomates e pepinos. Em outros países europeus existem muitas pesquisas com hidroponia, assim como instalações comerciais, nas quais se cultivam praticamente todas as espécies vegetais de importância econômica, além de outras com objetivo puramente científico. O Japão guarda, certamente, as instalações mais importantes do mundo no momento. Em Israel estão as mais modernas e avançadas unidades de pesquisas em hidroponia. Existem, também, inúmeras explorações comerciais especializadas no cultivo de hortaliças e flores de corte (MARY, 1998).

Segundo Martinez (1997), no Brasil a hidroponia está bastante difundida. O referido meio de obtenção de alimentos apresenta como alternativa para se obter produtos saudáveis, de excelente qualidade, praticamente isentos de agrotóxicos e de alto valor nutritivo. Entretanto, para se

cultivar uma espécie vegetal, torna-se importante o conhecimento de suas necessidades básicas assim como ter bases sólidas de todo o processo de produção de vegetais por hidroponia.

Para a instalação de um sistema de cultivo hidropônico é necessário que se conheça detalhadamente as estruturas básicas necessárias que o compõe (FURLANI, 1999). Os tipos de sistemas hidropônicos determinam estruturas com características próprias, sendo que os mais utilizados são:

O sistema *Nutrient Film Technique* (NFT) ou técnica do fluxo laminar de nutrientes, introduzida na Inglaterra por Allen Cooper, na década de 70, é composto basicamente de um tanque de solução nutritiva, de um sistema de bombeamento, dos canais de cultivo e um sistema de retorno ao tanque (Anexos 1 e 2). A solução nutritiva é bombeada aos canais e escoada por gravidade, formando uma fina lâmina de solução que irriga as raízes.

No sistema *Deep Film Technique* (DFT) ou cultivo na água, ou *floatin*, a solução nutritiva forma uma lâmina de 5 a 20 cm, onde as raízes ficam submersas. Não existem canais e sim uma mesa na qual circula a solução, através de um sistema de entrada e drenagem característico; com substratos, este cultivo é para hortaliças frutíferas, flores e outras culturas que têm o sistema radicular e a parte aérea mais desenvolvida.

Para Furlani *et al.* (1999), no Brasil, tem crescido nos últimos anos o interesse pelo cultivo em hidroponia predominando o sistema NFT, uma vez que esta é capaz de minimizar o gasto de água consumido neste cultivo, ter custo reduzido e, ainda, permitir um controle efetivo da nutrição e aeração das raízes. Para esses autores, muitas são as espécies cultivadas em hidroponia, destacando-se as hortaliças. Dentre elas, as principais folhosas cultivadas comercialmente no Brasil são: alface (80% do total) e agrião, rúcula, almeirão, couve-flor, salsinha, cebolinha, coentro, salsaão, entre outras, (20%). Praticamente todas estas espécies são produzidas através do sistema NFT, no entanto, alguns estados do Nordeste estão apresentando tendência em adotar o DFT em maior número dos casos, em razão das temperaturas mais altas encontradas nestes Estados.

Para Martinez (1997), no cultivo hidropônico, o solo é substituído por soluções nutritivas em sua função mais complexa, que é a de fornecer nutrientes minerais. Por esta razão pode-se dizer que os aspectos nutricionais são a base para o sucesso dos cultivos hidropônicos.

Diversas soluções nutritivas já foram propostas na literatura havendo, em alguns casos, diferenças marcantes entre elas com relação às concentrações dos macronutrientes, enquanto que para os micronutrientes as diferenças são bem menores.

A solução nutritiva proposta por Furlani (1998) *apud* Furlani *et al.* (1999) tem sido usada com sucesso para o cultivo hidropônico de diversas hortaliças folhosas em muitos Estados brasileiros, principalmente em São Paulo e em Minas Gerais. Esta solução básica de cultivo deve ter a composição apresentada pelo referido autor, apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de nutrientes (mg.L⁻¹)⁶ para o cultivo hidropônico de hortaliças folhosas proposta por Furlani (1998)

Fonte: Informe Agropecuário, set/dez.1999.													
Fonte	N-NO ₃	N-NH ₄	P	K	Ca	Mg	SO ₄	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
Furlani (1998)	174	24	39	183	142	38	52	0,4	0,02	2,0	0,4	0,06	0,06

Deve-se ajustar quimicamente a solução durante o crescimento e desenvolvimento das plantas e este ajuste depende da cultivar, do ambiente de crescimento, da época do ano e principalmente da qualidade da água usada no cultivo hidropônico (FURLANI *et al.*, 1999).

Furlani *et al.* (1999), explica que a composição da solução varia com o crescimento das plantas, sendo que a amplitude depende da fase de crescimento e do tamanho das mesmas, além do volume utilizado. Essa variação não é somente devido ao decréscimo das quantidades de sais disponíveis, mas também devido à sua variação qualitativa, uma vez que os elementos não são absorvidos igualmente, muito menos em quantidades constantes. O outro efeito é a variação do pH do meio, que pode produzir precipitações, retirando elementos essenciais (Fe, Mn, Ca e P) da solução.

Segundo Furlani *et al.* (1999), a troca da solução é feita em função da taxa de crescimento da planta, do volume de solução colocado à disposição das plantas, da variação de concentração e do pH, evitando possíveis contaminações fitossanitárias do sistema.

A capacidade do reservatório vai depender do número de plantas e da espécie a ser cultivada, bem como o tamanho da área de cultivo. Para cada 500 m² de área será necessário, aproximadamente, 4.000 L de solução nutritiva⁷.

Apesar de Rodrigues (2002), referir-se a hidroponia como uma técnica viável de cultivo de plantas com solução nutritiva na ausência ou na presença de substratos naturais ou artificiais,

⁶ mg.L⁻¹ = ppm

⁷ Informações adquiridas oralmente com o professor Dr. Jorge Barcelos (LabHidro) da Universidade Federal de Santa Catarina em 03 de novembro de 2004.

além de apresentar outras vantagens como: 1) haver um aumento da produtividade com menor impacto ambiental; 2) de ter a maior eficiência na utilização da água de irrigação e fertilizantes; 3) da redução da quantidade ou eliminação de alguns defensivos, percebe-se que a poluição ambiental pode ser uma desvantagem do cultivo hidropônico, caso seus efluentes sejam descartados no ambiente (solo, corpos de água) sem tratamento prévio.

Corre-se o risco de contaminar o lençol freático, principalmente, com os fertilizantes nitrogenados e pesticidas. Este problema pode ser maior se o sistema for aberto e se forem utilizados substratos que não se decompõem no solo e que poluem o ar ao serem derretidos para reutilização, como lã de rocha, utilizada no cultivo hidropônico com substratos.

Rodrigues (2002), afirma que quando há acúmulo de íons fitotóxicos (Cl^- , Na^- e SO_4^{2-}) na solução nutritiva, o descarte é feito em tanques de sedimentação e depois no sistema esgoto ou diretamente no esgoto quando disponível. Encontrar um método de descarte que diminua o impacto ambiental dos efluentes hidropônicos, também é um dos objetivos das pesquisas que necessitam ser desenvolvidas.

Segundo Rodrigues (1999), a situação torna-se supostamente mais agravante em áreas produtivas, em que o preparo profissional específico do agricultor e o nível de assistência ao cultivo hidropônico são ainda mais deficientes, como tem acontecido em algumas regiões da Itália, e também, no Brasil. Em alguns casos os efluentes não são reaproveitados, conseqüentemente, descartados sobre o solo, gerando sérios conflitos sanitários e ambientais, como a eutrofização dos corpos de água.

Diante da problemática ambiental e de saúde pública que pode ser gerada a partir do não gerenciamento adequado do efluente hidropônico e de demais efluentes, far-se-á necessário o estudo da ocorrência do fenômeno da eutrofização, dentre outros processos ambientais e de forma que possam contribuir para o tratamento desses efluentes.

3.3. ASPECTOS AMBIENTAIS E EFLUENTES

Em função do aumento das atividades industriais, agrícolas e da população urbana, houve uma aceleração a fenômenos como a eutrofização. Segundo Ricklef (2003), tal acontecimento é decorrente do excesso de nutrientes básicos como N e P nos corpos de água, podendo resultar no desenvolvimento massivo e indesejado de algas e macrófitas aquáticas, sendo à fertilização excessiva, permanente e contínua nos meios aquáticos uma das principais causas da eutrofização. Para Thomann e Mueller (1987), a eutrofização é o crescimento excessivo das plantas aquáticas,

tanto planctônicas quanto aderidas, a níveis tais que sejam considerados como causadores de interferências com os usos desejáveis do corpo de água.

Devido à diversidade de causas desse processo, as formas de evitá-lo tornam-se complexas. Comumente, procura-se evitar a introdução de nutrientes ou de matéria orgânica passível de mineralização. No entanto, nutrientes em excesso provocam aumento no crescimento de vegetais, podendo, em função de intenso crescimento, tornar-se um problema para a sobrevivência dos seres vivos aquáticos e para utilização da água (BRANCO e BERNARDES, 1983).

No início da década de 60, apesar da preocupação com a crescente degradação dos corpos de água, raros eram os que distinguiam as conseqüências da poluição e dos efeitos da eutrofização. No Brasil, segundo Azevedo Neto (1988), um exemplo típico dessa falta de conhecimento pode ser observado no sistema de disposição dos efluentes urbanos de Brasília, concebido sem se considerar os efeitos da eutrofização. Estes efeitos nos corpos de água, e em particular a celeuma causada pelo uso indiscriminado de detergentes fosforados, principalmente nos Estados Unidos nos meados deste século, discutidos por Vallentyne (1978), demonstra a complexidade e a atenção que este assunto merece.

Os efeitos negativos da eutrofização podem ser resumidos da seguinte forma, segundo Azevedo Neto (1988): (1) desenvolvimento excessivo e prejudicial de algas, proliferação de macrófitas aquáticas, etc; (2) alterações profundas da biota, com a substituição de espécies de peixes e outros organismos; (3) decomposição orgânica; (4) consumo e depleção de oxigênio dissolvido e anoxia; (5) degradação da qualidade da água, com alterações de composição, cor, turbidez, transparência, etc; (6) liberação de 4 gases e produção de maus odores; (7) formação de depósitos bentais e reciclagem de nutrientes; (8) prejuízos consideráveis para o uso da água em abastecimento, irrigação e para aproveitamentos hidroelétricos; (9) prejuízos diversos para recreação, turismo e paisagismo; (10) aumento da evaporação; (11) elevação de nível e entaves para o escoamento das águas; (12) produção de substâncias tóxicas; (13) condições propícias para a criação de mosquitos, larvas e outros vetores.

De maneira geral, o Nitrogênio e o Fósforo são os nutrientes que devem ser removidos ou ter suas cargas reduzidas nos efluentes, pois são considerados os principais limitantes ou controladores da produtividade primária (ESTEVES, 1988).

A presença de compostos ricos em Nitrogênio nos ambiente aquáticos são os problemas ligados à saúde humana, como é colocado por Méndez (2003). A “Síndrome do bebê azul”

(methaemoglobinemia em bebês) tem sido associada a nitratos e nitritos, como também os compostos nitrosaminas e nitrosamidas, que são formados a partir de nitratos, podem ser cancerígenos. No entanto, para Terblanche (1991), o NO_3 por si não é tóxico, mas este é precursor de NO_2 que pode induzir a methaemoglobinemia em crianças.

Tendo em vista essas questões apontadas anteriormente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na RESOLUÇÃO 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 dá outras providências”. O CONAMA, no uso das competências que lhe são conferidas pelos arts. 6º, inciso II e 8º, inciso VII, da Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto no 99.274, de 6 de junho de 1990 e suas alterações, tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno, e considerando que a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico aquático, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas.

O capítulo IV, Das Condições e Padrões de lançamentos de Efluentes, da mesma resolução, Art. 24, estipula que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, diretos ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedecem às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis; no Art. 28, os efluentes não poderão conferir ao corpo de água características em desacordo com as metas obrigatórias progressivas, intermediárias e finais, do seu enquadramento; no Art. 34, os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedecem as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis: § 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

O Capítulo VI: Disposições Finais e Transitórias traz no Art. 45, que o não cumprimento ao disposto nesta Resolução acarretará aos infratores as sanções previstas pela legislação vigente;

§ 1º Os órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, no âmbito de suas respectivas competências, fiscalizarão o cumprimento desta Resolução, bem como quando pertinente, a aplicação das penalidades administrativas previstas nas legislações específicas, sem prejuízo do sancionamento penal e da responsabilidade civil objetiva do poluidor;

§ 2º As exigências e deveres previstos nesta Resolução caracterizam obrigação de relevante interesse ambiental.

Este capítulo determina no Art. 48, que o não cumprimento ao disposto nesta Resolução sujeitará os infratores, entre outras, às sanções previstas na Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e respectiva regulamentação.

É importante ressaltar também, que a presença de metais pesados na água e em efluentes está aumentando devido o desenvolvimento industrial (TRAVIESO *et al.*, 2002). Conforme Canizares-Villanueva e Travieso (1991), a eliminação desses metais nos esgotos e nos corpos d' água pode criar sérios estragos na vida aquática, por serem acumulativos na cadeia trófica e produzem efeitos tóxicos e mudanças teratogênicas em plantas, animais e seres humanos (incluindo câncer), eles também permanecem nos sedimentos e são lentamente liberados na água receptora final.

A presença de metais muitas vezes está associada à localização geográfica, seja na água ou no solo, e pode ser controlada, limitando o uso de produtos agrícolas e proibindo a produção de alimentos em solos contaminados com metais pesados. Todas as formas de vida são afetadas pela presença de metais, dependendo da dose e da forma química. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os organismos, desde as bactérias até os seres humanos, desde que requeridos em baixas concentrações, do contrário, podem danificar os sistemas biológicos (SALGADO, 1996a).

Conforme Salgado (1996a), os metais são classificados em:

- 1) Elementos essenciais: Na, K, Ca, Fe, Zn, Co, Ni e Mg;
- 2) Micro-contaminantes ambientais: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho, tungstênio;
- 3) Elementos essenciais e simultaneamente micro-contaminantes: cromo, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel.

De acordo com Trevosrs *et al.* (1986), os efeitos tóxicos dos metais sempre foram considerados como eventos de curto prazo, agudos e evidentes, como anúria e diarreia sanguinolenta, decorrentes da ingestão de mercúrio. Atualmente, ocorrências a médio e longo prazo são observadas, e as relações causa-efeito são pouco evidentes e quase sempre sem sintomas.

A manifestação dos efeitos tóxicos está associada à dose e pode distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos, organelas e membranas celulares (SALGADO, 1996a e b).

O manganês é um metal semelhante ao ferro, porém mais duro e quebradiço. Os óxidos, carbonatos e silicatos de manganês são os mais abundantes na natureza e caracterizam-se por serem insolúveis na água. O composto ciclopentadienila-tricarbonila de manganês é bem solúvel na gasolina, óleo e álcool etílico, sendo geralmente utilizado como agente anti-detonante em substituição ao chumbo tetraetila (SALGADO, 1996b).

Os sintomas dos danos provocados pelo manganês no sistema nervoso central (SNC,) segundo Salgado (1996), podem ser divididos em três estágios: 1) subclínico (astenia, distúrbios do sono, dores musculares, excitabilidade mental e movimentos desajeitados); 2) início da fase clínica (transtorno da marcha, dificuldade na fala, reflexos exagerados e tremor); e 3) clínico (psicose maníaco-depressiva e a clássica síndrome que lembra o Parkinsonismo). Além dos efeitos neurotóxicos, há maior incidência de bronquite aguda, asma brônquica e pneumonia.

O Zinco (Zn), outro metal de extrema importância para as funções biológicas dos organismos vivos, desde que esteja dentro das concentrações recomendadas diariamente, do contrário, pode se tornar altamente perigoso para a saúde dos seres envolvidos com as altas concentrações desse metal.

Existem 2 tipos de toxicidade associada ao Zinco, segundo Trevors; Stratdon e Gadd (1986):

1) Toxicidade aguda – como consequência da ingestão de doses acima dos 5 g, que resulta num paladar metálico, náuseas e diversas perturbações gástricas;

2. Toxicidade crônica – em consequência do consumo prolongado de quantidades moderadamente altas de Zinco, o que resulta: - Num aumento do risco de doença coronária devido a um aumento da concentração do LDL e redução da concentração de HDL no plasma - Interação antagônica entre Zinco e Cobre (redução da absorção de Cobre que pode resultar na deficiência de Cobre e em anemia).

Biossorção de metais pesados de solução aquosa por microalgas tem atraído muita atenção o tratamento de efluente, que pode muitas vezes reduzir grandemente a concentração de metais pesados (YAN e PAN, 2002).

Tendo em vista, os dispositivos estipulados pelo CONAMA (Resolução 357/2005) e pelo Ministério Público de Santa Catarina, lei nº 5.793 de 15 de outubro de 1980, artigo 19, como também os efeitos tóxicos causados pelos metais pesados, far-se-á necessário

medidas quanto à remoção de compostos nitrogenados, fosforados e de metais tóxicos dos efluentes, domésticos, industriais, comerciais e agrícolas.

3.3.1. Alternativas de Tratamentos de Efluentes: Biorremocão de Nutrientes Através do Uso de Macrófitas Aquáticas e de Microalgas

O tratamento de esgoto é um processo predominantemente aeróbio (algumas vezes anaeróbio) e a presença de algas, facilita grandemente a oxigenação. Em pequenos corpos de água ou em tanques especialmente construídos, é necessária a aeração dos despejos, caso contrário ocorrerá a degradação anaeróbia com produção de odores desagradáveis (ALVES *et al.*, 2005)

As plantas aquáticas, como por exemplo, *Lemna* (HARVEY e FOX, 1973), *Eichhornia* (ROMITELLI, 1983), têm sido utilizadas visando à melhoria da qualidade do efluente, principalmente no que diz respeito à redução das concentrações de Nitrogênio e Fósforo (TRIPATHI & SHUKLA, 1991). Esses autores observaram, em condições de laboratório, altas reduções de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Nitrogênio e Fósforo, sólidos suspensos, alcalinidade, N-NH₃ (amônia), dureza, carbono orgânico dissolvido e coliformes no tratamento de esgoto doméstico e industrial, através de um tanque com aguapé seguido por um de alga e finalmente por um terceiro tanque novamente com aguapé.

A eficiência de tais tanques é afetada pela temperatura, luz, suprimento de nutrientes para as algas. Linhagens de algumas algas, tanto de alta como baixa temperatura, foram encontradas crescendo em tanques de oxidação. Muitas algas utilizam N-NH₃, beneficiando, portanto, os sistemas, pois as águas de descarga contendo N-NH₃ apresentam uma alta demanda de oxigênio, que é extremamente indesejável. Neste tipo de tratamento de efluente, é necessária a remoção do excesso de células algais, e estudo em plantas piloto sugere que o rendimento algal pode variar em torno de 105 toneladas por acre.

O uso integrado de microalgas e de macrófitas aquáticas, como exemplo, a *Lemna*, no tratamento de efluentes torna-se muito interessante, porque além de biorremediadora a *Lemna* ajuda na remoção das microalgas do efluente, como é apresentado nos estudos de Valderrama *et al.* (2002).

Arora e Saxena (2005), trabalhando com a *Azolla microphylla* no tratamento secundário do efluente municipal de Delhi (Índia), verificaram que houve um considerável crescimento da

macrófita e simultaneamente um decréscimo nos níveis de Fósforo, podendo constatar a eficácia da *A. microphylla* como biorremediadora.

Beltrão (1992); Anaga e Abu (1996); Olgúin (2000); Rodrigues (2000), têm demonstrado uso das microalgas, principalmente a *Chlorella* spp., *Chlorella minutissima* e a *Spirulina* spp. como biorremediadoras nos tratamentos de esgotos e outros tipos de águas residuais de efluentes, como de uma indústria de suco de laranja, de uma companhia de fertilizante na Nigéria e de criação de suínos.

Méndez (2003), trabalhando com *Chlorella* spp. No tratamento do efluente de águas residuais provenientes de lagoas de oxidação com tratamento secundário da planta do Rio Frío, obteve resultados satisfatório na remoção de 75,33% de P-total, 70,61% de N-NH₃ e 65,67 de N-NO₃.

Lau *et al.* (1994), compararam os efeitos de duas diferentes fontes de N-orgânico sobre o crescimento da *Chlorella pyrenoidosa*. O efluente sintético que foi empregado no estudo foi enriquecido com peptona e uréia testado sob condições axênica e aberta. Observaram, que quando a peptona foi usada como fonte de N-orgânico, maior divisão celular foi encontrada na cultura axênica do que na aberta. Em contraste, quando a fonte de N-orgânico foi uréia, a cultura aberta teve maior densidade celular do que tratamento axênico. No efluente enriquecido com peptona houve uma significativa redução de N-NH₄ de 99% da cultura axênica e de 88% da cultura aberta, enquanto que no efluente enriquecido com uréia houve uma remoção de 50% de N-NH₄ na cultura axênica e uma acumulação de N-NH₄ na cultura aberta. Esses autores, concluíram que os mecanismos limitantes do crescimento algal na cultura com peptona e na com uréia foram diferentes: o efluente rico em peptona retratou N-limitante para o crescimento algal, enquanto que o baixo pH, juntamente com o P-limitante no efluente com uréia, limitou o crescimento da *C. pyrenoidosa*.

Nas lagoas de estabilização e nos tratamentos de efluentes, é importante o conhecimento dos efeitos do pH no crescimento de microalgas e o subsequente impacto na degradação da matéria orgânica (MAYO & NOIKE, 1994). O papel do pH em lagoas de oxidação é complexo.

Tem sido estabelecido que o pH influencia a relativa fração de CO₃⁻², HCO₃, e o CO₂ livre. Acima de pH 8, carbono inorgânico está quase inteiramente na forma de HCO₃⁻ e CO₃⁻² (MAYO e NOIKE, 1994). Segundo Azov *et al.* (1982), o CO₂ é a fonte de carbono ionizado dissolvido de maior preferência das microalgas para a fotossíntese.

Outros efeitos indiretos do pH, colocado por Azov & Godmam (1982), inclui toxicidade da N-NH₄ para as células vivas em que pH influencia na proporção de NH₃ livre e N-NH₄, além da disponibilidade de PO₄-P para algas e microalgas, abordado por Bogan *et al.* (1960) *apud* Mayo & Noike (1994).

Mayo & Noike (1994), citam a influência do pH na regulação da biomassa, na competição de espécies algais e microalgais e na fotossíntese algal e microalgal. Mayo & Noike (1994), pesquisaram os efeitos da concentração de íons de hidrogênio (pH) no crescimento da *C. vulgaris* e de bactérias heterotróficas em pH entre 3 e 11,5. Concluíram que a microalga teve sua ótima produção de biomassa em pH 5,5 ~ 8 e apresentou-se mais sensível em pH alcalino do que em pH ácido.

Lau *et al.* (1994), ressalta que o sucesso de um sistema de tratamento algal conta fortemente com o crescimento da célula e com a absorção do nutriente que na transformação é afetado pela composição do efluente. O crescimento algal e a eficiência na remoção de Nitrogênio dependem visivelmente da composição da água residual.

As microalgas, conforme colocado por Syrett (1981, 1988) *apud* Lau *et al.* (1994), dão preferência às fontes de Nitrogênio inorgânico como N-NH₄ e N-NO₃, mas uréia e aminoácidos simples podem também ser utilizados.

Para Lau *et al.* (1995), crescimento algal e absorção rápida de nutrientes não são afetados somente pela disponibilidade de nutrientes, eles também dependem de complexas interações entre fatores físicos tal como, pH, intensidade de luz, temperatura e fatores bióticos. O primeiro fator biótico que significativamente influencia o crescimento algal é a densidade inicial. Trabalhando com quatro distintas densidades celulares (5×10^5 cells. mL⁻¹, 1×10^6 cells. mL⁻¹, 5×10^6 cells. mL⁻¹, 1×10^7 cells. mL⁻¹) de *C. vulgaris*, Lau *et al.* (1995), verificaram a eficácia do crescimento e da absorção dos nutrientes, sendo que a densidade de 1×10^7 cells. mL⁻¹, foi a que demonstrou melhor beneficiamento no tratamento do efluente, removendo o nitrato com 07 dias. No entanto as concentrações 1×10^6 cells. mL⁻¹, 5×10^6 cells. mL⁻¹, segundo os autores, exibiram um crescimento modelo, com a fase lag de 4-6 dias (fase de indução) seguido pela fase log (fase exponencial), apresentando também, um bom desempenho de incremento celular e de remoção de N e P.

Valderrama *et al.* (2002), testaram a utilização da microalga *Chlorella vulgaris* e da macrófita *Lemna minuscula* no tratamento do efluente recalcitrante de etanol e ácido cítrico diluído a 10%, por causa do baixo pH e dos altos níveis de matéria orgânica, usando primeiro a

Chlorella vulgaris seguida da *Lemna*. Constataram a redução de N-NH₄ de 71,6%, de Fósforo de 28%, após 4 dias de incubação da *C. vulgaris*. Além disso, a *Lemna* teve um bom crescimento no tratamento, precipitando a microalga e reduzindo a matéria orgânica e a cor escura em 52%, depois de 6 dias de incubação. Esta forma de tratamento conjugado com microalga/macrófita, pode ser uma boa alternativa na retirada da microalga do efluente, não necessitando de centrifugação, conseqüentemente, não sendo necessário o uso de centrífugas.

Travieso *et al.* (2002), colocam que os tradicionais processos físico-químicos usados para remoção de metal pesado podem ser classificados nas bases dos princípios complexos: (a) troca de íons, (b) transferência de membrana. O processo de troca de íons tem uma desvantagem de lançar reagentes químicos tóxicos usados em regeneração de resinas no ambiente. O processo de membrana não tem somente a desvantagem descrita anteriormente, como também consomem uma quantidade alta de energia. Em vista disso, procuraram trabalhar uma nova solução para esse problema, através do desenho e evolução de um reator (BIOALGA), onde imobilizações de microalgas usando um intensivo sistema de cultivo foram usadas para a remoção de metais pesados. Desta forma, esses autores, estudaram a biorremoção de metais da água e de efluentes através do uso da microalga *Scenedesmus obliquus* em um bioreator. Obtiveram uma eficiência de remoção de 94,5 % durante 11 dias de experimento. Esses autores concluíram que o método do bioreator “BIOALGA”, combina com as vantagens da microalga imobilizada em intensiva cultura com sua capacidade de remoção de metais pesados por biossorção. Para esses autores, esse sistema é eco-sustentável e contribui para evitar a poluição ambiental.

Tendo em vista, que as microalgas além de fotossintéticas e ótimas fontes alimentícias, dentre outras propriedades, são potencialmente biorremovedoras de metais e de N e P, sendo de grande relevância o conhecimento da biologia, de suas propriedades e da fisiologia desses microorganismos, para sua correta aplicabilidade.

3.4. MICROALGAS

O termo microalga faz referência aos microorganismos que contém clorofila e outros pigmentos fotossintéticos sendo capazes de realizar fotossíntese. São microscópicos e são representantes dos um dos seres vivos mais antigos e os mais importantes do planeta. Assim, no grupo incluem-se os organismos de dois tipos celulares distintos: cianobactérias, com estrutura celular procariota e as restantes microalgas de estrutura celular eucariota (LEE, 1989).

Richmond (2004), coloca que segundo a classificação de Lee (1989), baseada em uma membrana adicional em volta do envelope cloroplástico, as microalgas estão divididas em quatro grupos. O primeiro grupo inclui as algas procarióticas: Cianobactéria e Prochlorophyta. Os outros grupos são classificados a respeito da evolução dos cloroplastos, incluindo as algas Eukarya, que provavelmente, adquiriram núcleo definido e cloroplastos ao longo de diferentes eventos evolucionários. O segundo grupo tem o cloroplasto cercado somente por duas membranas cloroplásticas, incluindo neste as Glaucophyta, Rhodophyta e Chlorophyta. O terceiro e quarto grupo, das Euglenophytas e das Dinophytas têm os cloroplastos rodeados por apenas uma ou duas membranas adicionais do retículo endoplasmático, incluindo neste último as Cryptophyta, Prymnesiophyta, Bacillariophyta, Xanthophyta, Eustigmatophyta, Raphidophyta e Phaeophyta.

De acordo com Richmond (2004), avalia-se em mais de 30.000 as espécies de microalgas existentes representando um recurso praticamente inexplorado, já que somente umas 50 espécies foram estudadas com detalhes, a nível fisiológico e bioquímico.

Em muitas culturas as microalgas foram e ainda são usadas como complementos alimentícios. Os Astecas cultivavam *Spirulina* e *C. vulgaris* no Lago Texcoco e suplementaram seu alimento com esta biomassa algal, que é rica em proteína. As microalgas verdes microscópicas (Chlorophyceae) contêm aproximadamente 10% de minerais, 44% de albumina, 12% de ácidos graxos, 32% de fibras totais e 2% de clorofila do peso seco (DAVIS, 1996 e PANIANGUA, 2003).

Waldenstedt *et al.* (2003), obtiveram resultados satisfatórios quanto à utilização de microalgas como complemento dietético e alimentar de alta qualidade para a humanidade e para os animais.

Richmond (2004), coloca que uma utilidade das microalgas de grande importância é a depuração de águas residuais e gases de combustão, a partir de cultivos intensivos destes organismos. Uma das primeiras aplicações em desenvolver-se foi seu emprego no tratamento terciário das águas residuais urbanas. A biomassa obtida dos cultivos de microalgas pode ser utilizada na elaboração de biocombustíveis, já que constitui uma fonte ainda não suficientemente explorada de energias limpas, e também, como biofertilizantes.

Entre os fatores ambientais mais importantes que exercem influência fisiológica e controlam o crescimento de algas e microalgas em ambientes aquáticos estão luz, assimilação de nutrientes (N e P), pH e temperatura. Em águas poluídas a qualidade e a carga de matéria orgânica, presença de substância tóxica e assimilação de carbono inorgânico são também,

reconhecidos como parâmetros que afetam a atividade fotossintética (DOR e SVI, 1980) *apud* BELTRÃO (1992).

O Nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos. Após o Carbono, o Nitrogênio é o elemento com maior participação, em termos quantitativos, na matéria seca da alga (RICHMOND, 1986a), sendo também responsável pela formação das proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. Vários compostos nitrogenados, tanto orgânicos como inorgânicos, podem servir como fonte de Nitrogênio para o crescimento de diversas microalgas.

Igualmente, o Fósforo tem grande importância na constituição celular das microalgas. Ele atua de forma significativa na maioria dos processos celulares, especialmente naqueles envolvidos na geração e transformação de energia, fazendo parte de compostos como ATP, GTP, entre outros. Além de participar na composição dos ácidos nucleicos, fosfolipídeos, nucleotídeos e fosfoproteínas (ESTEVES, 1988). Por isso, que estes microorganismos se desenvolvem muito bem em águas residuais (efluentes), justamente, pelo fato destes apresentarem grandes concentrações, principalmente, de Nitrogênio e Fósforo.

Geralmente as algas pertencentes às divisões Cyanophyta e Chlorophyta são comumente mais utilizadas como biorremediadoras na ficobiotecnologia.

3.4.1. Classe Chlorophyceae

A maioria das algas verdes pertence a este grupo diversificado, apresentando divisão celular envolvendo um ficoplasto. Segundo Raven (1996), a exclusividade desta característica indica que nenhum outro grupo de organismos derivou de membros desta classe. A classe Chlorophyceae inclui algas unicelulares flageladas e não-flageladas, algas coloniais móveis e não-móveis, algas filamentosas e algas formando lâminas celulares. Os membros destas vivem principalmente em água doce, embora algumas poucas espécies planctônicas unicelulares ocorram em águas marinhas costeiras (HAVEN, 2001).

3.4.2. Caracterização da microalga *C. vulgaris*

A *C. vulgaris* utilizada pertence ao phylum Chlorophyta, classe Chlorophyceae, ordem Chlorococcales, família Oocystaceae (Hoek *et al.*, 1995).

É uma microalga verde unicelular de tamanho entre 2 a 4 µm com mancha ocelar e vacúolos contráteis. Segundo Raven (1996), esta espécie é considerada uma Chlorophyceae

unicelular não-móvel. 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.

A *C. vulgaris* foi descoberta pelos Japoneses, tradicionais consumidores de algas, que a apreciam e a utilizam normalmente como complemento alimentar, principalmente, por esta espécie apresentar alta concentração de vitaminas B1, B2, B6, B12, E, ácido fólico, ácido nicotínico, clorofila a e b, proteína, aminoácidos, sais minerais, lipídeo, carboidrato pigmentos como astaxantina, xantofila e β -caroteno, constituindo desta forma, uma rica fonte de alimento e de medicamento (BOLD, 1985).

Esta espécie de Chlorophyceae é a primeira microalga a crescer em cultura e foi usada extensivamente em estudos que revelam algumas das etapas básicas da fotossíntese. A facilidade de manter a *C. vulgaris* em cultura torna-a um microorganismo ideal.

Os primeiros estudos científicos desenvolveram-se na II Guerra Mundial por alemães e norte americanos objetivando encontrar complementação alimentar eficiente para usar nos campos de batalha. A *C. vulgaris* muito utilizada pela National Aeronautics and Space Administration (NASA), nas missões espaciais, como suplemento para os astronautas.

Yan e Pan (2002), colocam que a capacidade das microalgas de fotossintetizar e a posição de produtoras primárias nas cadeias tróficas, convertem-lhes em organismos ideais para acumularem metais.

Há alguns organismos aquáticos que podem acumular metais pesados, por exemplo, a microalga *Euglena gracilis* pode acumular acima de 5 mg.L^{-1} de íon de Zn (peso seco) sem efeitos tóxicos (CAÑIZARES-VILLANUEVA e TRAVIESO, 1992). Para outros organismos, o sistema enzimático é inibido e seus processos físicos e fisiológicos são afetados. Algumas plantas e outros organismos fototróficos como microalgas têm forte afinidade com metais polivalentes, devido o processo de biossorção (ILANGO VAN, 1992).

Segundo Travieso *et al.* (2002), essa afinidade por metais polivalentes é basicamente devida a dois fatos:

- a) A necessidade dessa presença em locais ativos de enzimas essenciais que são complexas nas vias metabólicas;

b) Os processos de bioadsorção (interações física-química em todas as células/ nível de membrana) e bioacumulação (rápida atividade intracelular).

A microalga *C. vulgaris* tem demonstrado que é capaz de absorver grandes quantidades de metais, principalmente Cr^{4+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} e Hg^{2+} . Conforme Yan e Pan (2002), o processo que a microalga realiza para incorporar os metais a suas células consiste em duas etapas. A primeira delas, denominada absorção, transcorre em muito pouco tempo e é muito similar tanto na parede celular como em toda a célula. Um dos fatores que contribui para a eficácia deste sistema é a composição da parede celular desta microalga, que possui uma mescla complexa de açúcares, glucosamina, proteínas e ácido urônico.

A segunda fase, chamada bioacumulação, requer um período maior e diferencia-se da primeira etapa, pois se trata de um processo ativo que pode intervir no metabolismo da célula. Por esta razão, aparecem diferenças significativas entre a quantidade de metais acumulados pelas distintas partes da célula que pode ser devido às biomoléculas presentes na membrana que pode se unir aos metais (YAN e PAN, 2002). De acordo com os motivos supracitados, faz-se possível a utilização da *C. vulgaris* como biorremediadora de metais, como se tem evidenciado na literatura.

A sensibilidade ao cobre varia entre as microalgas (SOLDO e BEHRA, 2000), sendo que a toxicidade ao Cu é devido principalmente aos íons livres (KNAUER *et al.*, 1997). Segundo Yan e Pan (2002), metais tóxicos podem afetar a fotossíntese microalgal, crescimento, atividade enzimática e respiração. Um mecanismo de tolerância pela microalga é a exclusão fisiológica de íons devido à redução da permeabilidade da membrana celular (YAN e PAN, 2002).

Knauer *et al.* (1997), observaram que bioacumulação de Cu por microalga consiste de um processo de adsorção rápida passiva seguido de uma atividade intracelular lenta. O primeiro passo rápido é reversível e contém o processo de adsorção, troca de íons, coordenação, quelação e microprecipitação. O segundo é lento e é muitas vezes irreversível e pode ser devido ao número de mecanismos incluindo ligação covalente, precipitação da superfície, reação de redox ou maioria das vezes, difusão no interior da célula, ligação de proteínas e outro local intracelular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ABORDAGEM

A parte experimental tinha como objetivos: a verificação do crescimento da *C.vulgaris* no efluente hidropônico e biorremoxão do Nitrogênio, do Fósforo e dos metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) através do uso da microalga.

Os procedimentos utilizados na pesquisa podem ser visualizados através do resumo que foi esquematizado no fluxograma explicativo (Figura 1).

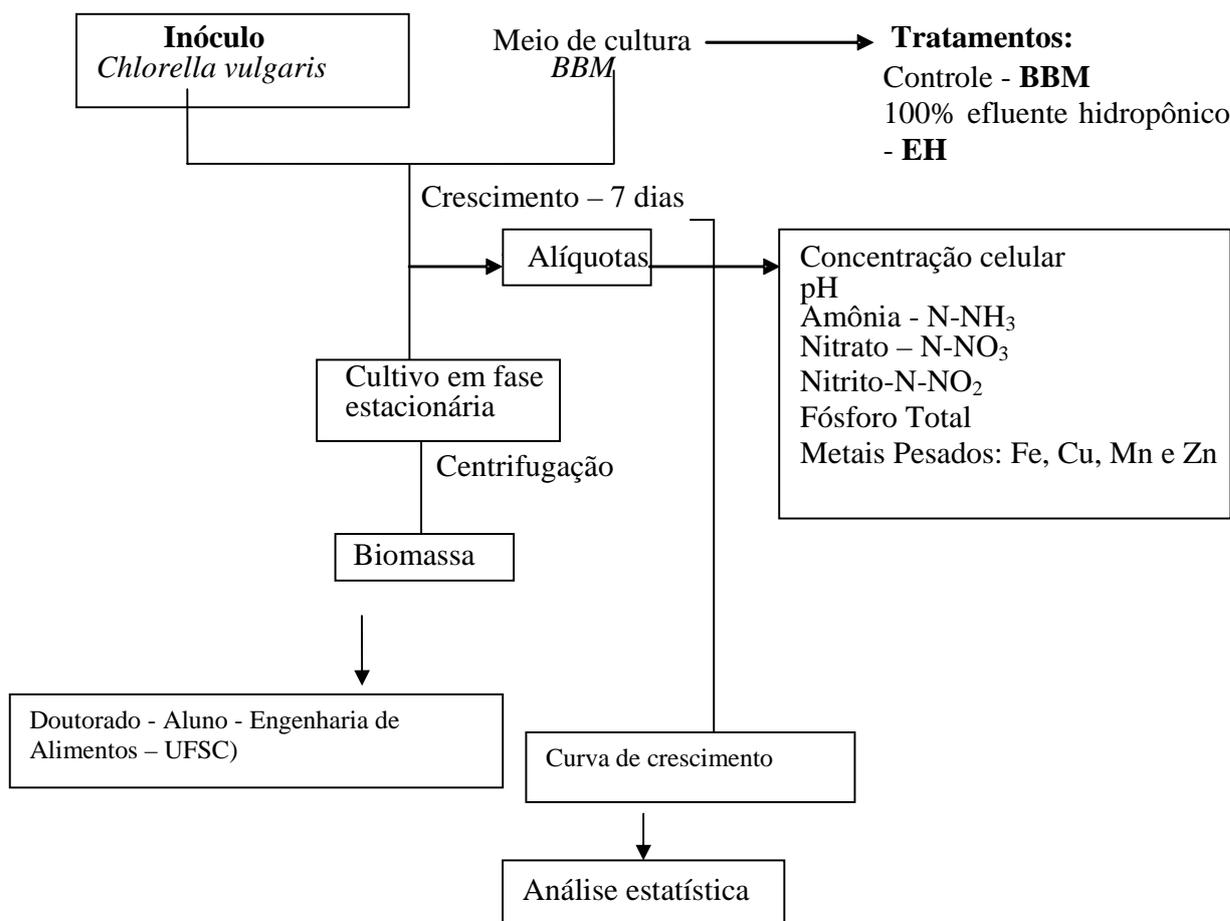


Figura 1- Fluxograma explicativo dos materiais e métodos utilizados no experimento.

4.2. EXPERIMENTO

4.2.1. Local

O experimento foi desenvolvido por um período de 7 dias, no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizada no bairro Itacorubi – Florianópolis, SC.

4.2.2. Efluente Hidropônico

O efluente hidropônico utilizado no experimento foi obtido junto ao Laboratório de Agricultura Irrigada e Hidroponia (LabHidro) do Departamento de Engenharia Rural, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. E sua caracterização está Tabela 2.

O material foi coletado após a troca semanal da solução nutritiva hidropônica e armazenado e em galões plásticos de 25 L, mantidos sob refrigeração (+ou- 10° C) até o início do experimento.

Tabela 2: Características Físicas e Químicas do efluente hidropônico (EH). Resultados obtidos através das análises laboratoriais, realizados no primeiro dia de experimento, fornecidos pelo Laboratório Hidroclínica - Análises Químicas, exceto pH e condutividade, que foram medidos no LabHidro – UFSC

Parâmetros	Valor médio de 4 repetições
Ph	5,0
Condutividade	1,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Demanda Química de Oxigênio	23,94 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{O}_2$
Demanda Bioquímica de Oxigênio	5,40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{O}_2$
Amônia - N-NH ₃	26,60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Nitrato - N-NO ₃	226,50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Nitrito - N-NO ₂	0,27 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Fósforo Total – P-Total	35,00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato Total - SO ₄ -Total	258,50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Fé	1,949 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Mn	0,259 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Cu	0,04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Zn	0,11 mg.L ⁻¹
----	-------------------------

4.2.3. Culturas Estoques

A cepa de *C. vulgaris* foi cedida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e cultivada em Bold's Basal Medium (BBM), segundo composição de Cañizares-Villanueva *et al.* (2000), demonstrada na Tabela 3. A cultura foi mantida em tubos de ensaio de 10 mL sob areação constante, temperatura controlada em 25±2 °C, pH 6,8 e iluminação contínua de 80 µmol/m²s, provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40 w.

Para a propagação, a cultura foi repicada de forma asséptica, através da diluição de 1 mL de cultura em 9 mL de meio Bold's Basal Medium, em tubos de ensaio a cada 12 dias e foram incubadas nas mesmas condições supracitadas.

Tabela 3: Composição do meio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) em mg.L⁻¹, segundo Cañizares-Villanueva *et al.* (2000)

Nutrientes	Quantidades
NaNO ₃	250
KH ₂ PO ₄	175
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
NaCl	25
EDTA	50
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4,98
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,82
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0,72
CoCl · 6H ₂ O	0,38
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,44
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,57

4.2.4. Preparo do Inóculo

A cultura contida nos tubos de ensaio foi transferida de forma asséptica para Erlenmeyer contendo 40 mL de meio Bold's Basal Medium e, posteriormente, foi incubada por 6 dias a 25±2 °C em fotofase de 12 horas. Após este procedimento a cultura foi vertida em Erlenmeyer contendo 350 mL do mesmo meio e incubada nas mesmas condições já descritas acima.

O crescimento até a fase exponencial ($2,5 \times 10^6 \text{ cell.mL}^{-1}$) serviu como inóculo, que foi transferido num volume correspondente a 4,5 % (v/v) para fotobiorreatores cônicos invertidos de 4000 mL contendo 3700 mL de meio de cultura estéril de quatro diferentes tratamentos.

4.2.5. Unidades Experimentais

Em janeiro de 2005, realizou-se o experimento com a espécie de microalga *C. vulgaris* e com o meio efluente hidropônico, durante 7 dias, constando assim dois distintos tratamentos: cultivo em BBM, que foi considerado como cultivo referência (controle) para a curva de crescimento; cultivo em efluente hidropônico EH. Cada tratamento foi realizado em 4 repetições independentes. Os tratamentos BBM e efluente hidropônico, estão representados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

Os fotobiorreatores cônicos contendo 3.700 mL de meio Bold's Basal Médium e de efluente hidropônico foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. Após resfriamento foi acrescentado 3,7 mL de vitamina comercial (citoneurim), somente no BBM.

O cultivo manteve-se sob temperatura controlada em 21 ± 2 °C, sob areação constante com volume de ar de 0,5 L/min e iluminação contínua de $150 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40 w.



Figura 2 - Crescimento da *Chlorella vulgaris* no tratamento T (cultivo comercial BBM), durante 07 dias de experimento, janeiro de 2005.



Figura 3 - Crescimento da *Chlorella vulgaris* no tratamento T1 (efluente hidropônico), durante 07 dias de experimento, janeiro de 2005.

4.2.6. Parâmetros Determinados

A taxa de crescimento microalgal foi monitorada a partir da determinação da densidade celular da cultura algal a cada 24 horas, através da contagem do número de células em microscópio utilizando o método Câmara de Neubauer de Guillard (1973).

A remoção de N e P e de metais pesados do efluente hidropônico pelas microalgas foi determinada mediante análises química, tais como, P-Total, N-NH₃, N-NO₃, N-NO₂, Fe, Mn, Cu e Zn das amostras no tempo inicial e final (sétimo dia) do experimento. Para a realização das análises foi tomado 100 mL da suspensão algal de cada um dos tratamentos e filtrada em membrana de 0,45µm. O filtrado foi recuperado para analisar N-NH₃, N-NO₃, N-NO₂, P-Total, Fe, Mn, Cu e Zn, seguindo metodologia descrita pela APHA (1992) para N e P. Os metais foram determinados conforme metodologia da *Analytical for Atomic Absorption Spectrophotometry* (1983). Utilizando equipamento Perkin Elmer modelo 3300 e padrões da Merck para construção das curvas analíticas. O pH foi medido com o pHômetro diariamente no local do experimento.

4.3.7. Análise Estatística

Para a análise das variáveis estimadas, comparou-se as médias dos tempos entre os tratamentos BBM e EH, através do teste de hipótese na aleatorização MULTIV (PILLAR, 2001).

A medida de semelhança utilizada na análise foi a distância euclidiana.

H₀: Não existe diferença no crescimento celular nos diferentes tratamentos, no decorrer do tempo (sete dias);

H_a: Existe diferença no crescimento celular nos diferentes tratamentos, no decorrer do tempo (sete dias).

Empregou-se o seguinte modelo estatístico, para valores do crescimento celular de ambos os tratamentos:

$$\gamma_{ij} = \eta + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Em que γ_{ij} é a observação do tratamento i na repetição j , i , é o tratamento, j , é o tempo, p.ex., $j=t_0, j=t_1, \dots, j=t_7$; η , a média geral; τ_i , o efeito do tratamento i ; e ϵ_{ij} , o erro associado à observação j .

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DENSIDADE CELULAR

Os resultados obtidos no crescimento da *C. vulgaris* nos cultivos BBM e efluente hidropônico estão apresentados no Anexo 4. No início do experimento a densidade celular do inóculo de *C. vulgaris* foi de $(2,5 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1})$ para ambos tratamentos, atingindo no final dos 7 dias a densidade celular de $10,6 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ para o cultivo controle e $5,7 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ para o cultivo em efluente hidropônico (Figura 4). Após sete dias de cultivo, observou-se que no tempo 1 o crescimento teve um leve aumento celular, não havendo diferença significativa estatisticamente ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos. No entanto, a partir do segundo dia houve diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos BBM e EH (Anexo 5).

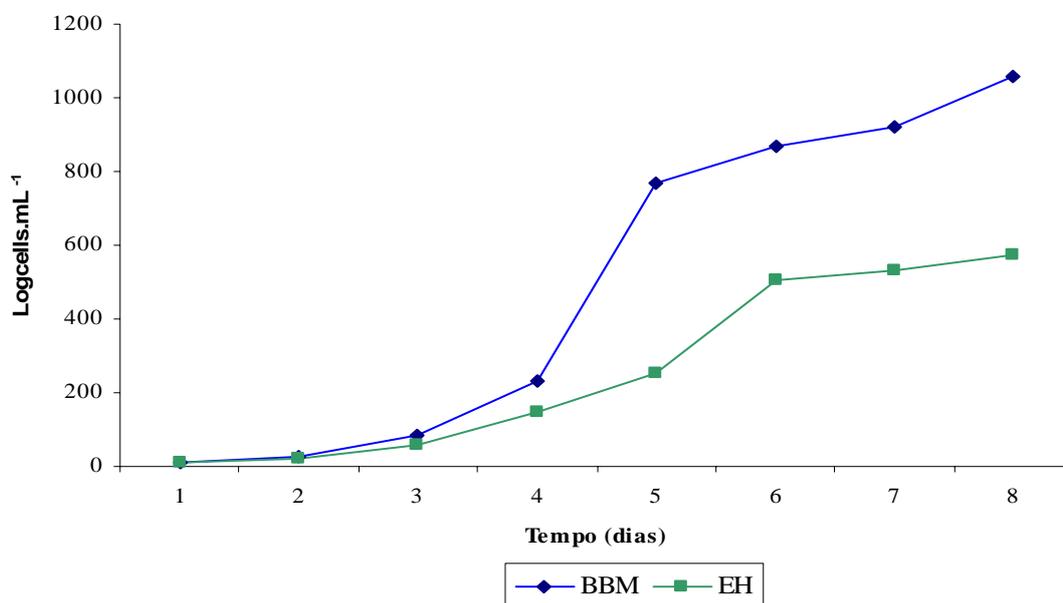


Figura 4 Curva de crescimento da *Chlorella vulgaris* no controle BBM e no efluente hidropônico no decorrer de sete dias, em Janeiro de 2005. Os valores médios do gráfico encontram-se no Anexo 5.

Houve diferença entre os tratamentos a partir do segundo dia. No entanto, percebeu-se que não afetou na efetividade de biorremoxão de Nitrogênio, de Fósforo e de metais pesados e de

crescimento da *C. vulgaris*. Sabe-se que nos meios de cultivo comerciais, as quantidades de nutrientes estão balanceadas em dosagens necessárias para um bom desempenho no crescimento da microalga. No efluente hidropônico, as quantidades de nutrientes não estão em uma dosagem específica para a *C. vulgaris*, um dos motivos de haver a diferença significativa no crescimento da microalga entre os meios analisados neste trabalho.

Lau *et al.* (1995), testaram os efeitos de diferentes densidades iniciais de inóculo sobre o crescimento da *C. vulgaris* e também na eficiência de absorção de N e P pela microalga. A densidade inicial do inóculo da *C. vulgaris* de $2,5 \times 10^6$ cells.mL⁻¹ utilizada no experimento foi igual tanto para o BBM quanto para o EH. No entanto, a microalga estava mais adaptada ao meio BBM, ou seja, a *C. vulgaris* se adaptou bem ao novo meio de cultivo, demonstrando ter sido eficaz no incremento da biomassa e na biorremocção, equivalendo com os resultados apresentados pelos autores supracitados, com a densidade média de $1,0 \times 10^6$ cells.mL⁻¹.

Pode-se notar que a densidade celular demonstrou que o processo de adaptação fisiológica da *C. vulgaris* no efluente hidropônico, como meio de cultura, é eficiente em termos de aumento da densidade celular das células, no decorrer dos setes dias de crescimento microalgal.

A *C. vulgaris*, como outras microalgas citadas em outros trabalhos que tratam sobre a biorremocção, segundo Méndez (2003), tem a capacidade de assimilar e incorporar Fósforo e Nitrogênio, em suas células, para os utilizar nos processos de fotossínteses e respiração. Sendo que esses compostos são os principais requerimentos nutricionais para o crescimento e desenvolvimento microalgal, quando são acrescentadas em uma solução rica nestes elementos, como é o caso do efluente hidropônico.

Percebe-se, que tais processos fisiológicos, citados anteriormente, foram visivelmente demonstrados através do crescimento da *C. vulgaris* (Anexo 4) e das porcentagens de remoção do Fósforo Total e das formas de Nitrogênio Inorgânico (Figura 7) do efluente hidropônico apresentadas no experimento.

A alta concentração inicial de 226 mg.L^{-1} de N-NO₃ do efluente hidropônico não demonstrou afetar o crescimento algal da *C. vulgaris*. Fato que também foi demonstrado no trabalho de Jeanfils *et al.* (1993), quando observaram que a *C. vulgaris* pode crescer em concentrações relativamente altas de NO₃, embora tenha ocorrido um leve efeito inibitório com a alta concentração testada (97 mM)⁸.

5.2. pH

No decorrer dos setes dias de crescimento algal, mediante verificação diária do pH, percebeu-se, também, que houve uma variação desse em ambos os tratamentos, ficando na faixa de 6,8 a 8,8 no cultivo em BBM e 5,0 a 5,3 no cultivo em EH, podendo ser observado na Figura 5.

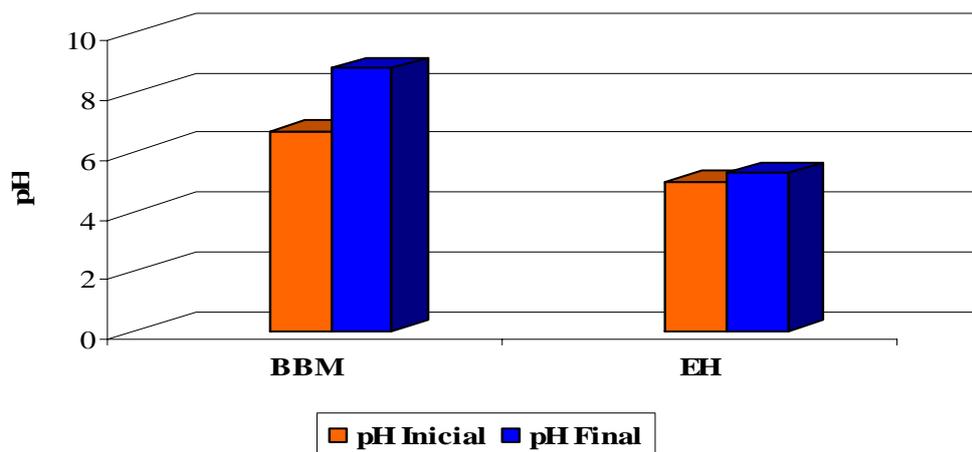


Figura 5 - Variação do pH no BBM e EH durante o crescimento da *Chlorella vulgaris* nos sete dias de cultivo. Os valores de pH são encontrados no Anexo 10.

O pH é outro fator que exerce influência fisiológica e controla o crescimento microalgal. As espécies de *Chlorella* spp., desenvolvem-se bem em meios com pH entre 5.0 e 9.0; no entanto, quando o meio de cultivo se apresenta ácido (< 5.0), pode inibir o crescimento das células. Como ocorreu no trabalho de Lau *et al.* (1994), com a microalga *C. pyrenoidosa*, onde o pH 4.0 inibiu consideravelmente o crescimento. No efluente hidropônico o pH varia entre 5.0 a 6.0, no caso do efluente utilizado no presente estudo, o pH inicial ficou em 5.0 e o pH do meio BBM ficou em 6.8 podendo ser um dos fatores favoráveis, além da absorção de N e de P, para o incremento da biomassa algal, visualizado na Figura 2.

Os estudos de Mayo & Noike (1994), sobre o efeito da concentração de íons de hidrogênio no crescimento da *C. vulgaris* entre pH 3.0 e 11.5, revelaram a preferência da microalga pelo pH entre 5.5~8.0 e, também, a sensibilidade da espécie em pH alcalinos, afetando a produção da biomassa microalgal. Estes dados confirmam a eficiência de crescimento da *C. vulgaris* tanto no efluente hidropônico como no meio BBM, com os respectivos pH $5.0 \geq 5.5$ e $6.8 \geq 8.8$.

⁸ mM= milimol (vol/Molar)

5.3. CONCENTRAÇÃO MÉDIA E BIORREMOÇÃO DE N-NH₃, N-NO₃, N-NO₂ E P-TOTAL E DE METAIS PESADOS (Fe, Mn, Cu, Zn)

Os valores médios da concentração de N-NH₃, N-NO₃, N-NO₂ e P-Total no início e no final do experimento com *C. vulgaris* estão representados graficamente na Figura 6.

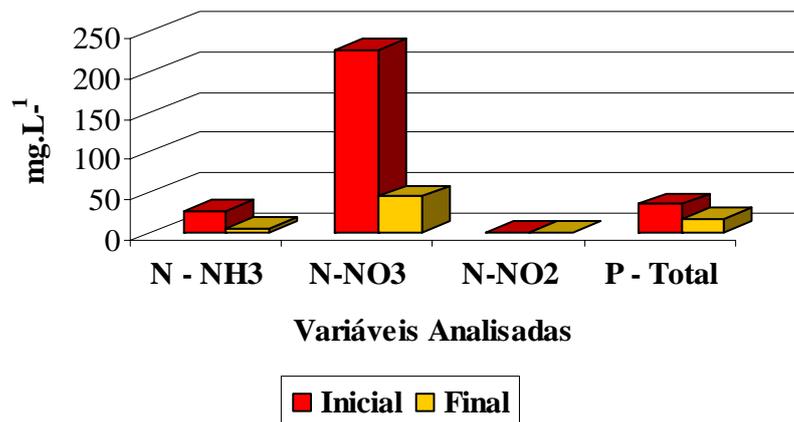


Figura 6 - Valores médios da concentração de Fósforo Total e Nitrogênio Inorgânico (N-NH₃, N-NO₃, e N-NO₂), ao longo de sete dias. Os valores expressos encontram-se no Anexo 6.

A caracterização do efluente hidropônico demonstra que os compostos que contém Nitrogênio inorgânico expressados como NO₃, NO₂, N-NH₃ e P-Total apresentaram as seguintes concentrações respectivamente em mg.L⁻¹: 226,50; 0,27; 26,50; e 35,00. Levando em consideração os valores máximos dessas variáveis (10,0 mg.L⁻¹ de N-total; 20 mg.L⁻¹ de N-NH₃; e 1,0 mg.L⁻¹ de P-total) permitidos pela resolução do CONAMA 357/2005 e dispositivo do Ministério Público de Santa Catarina, lei nº 5.793 de 15 de outubro de 1980, (artigo 19) para efluentes, as concentrações supracitadas das respectivas variáveis químicas, contidas neste efluente, estão acima dos valores estipulados pelas legislações ambientais vigentes.

Os resultados apresentados Figura 7 demonstraram a eficiência da biorremediação do Fósforo e do Nitrogênio através da *C. vulgaris*.

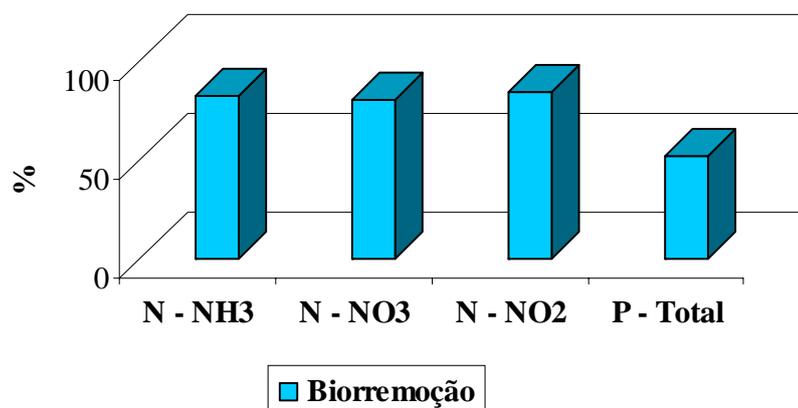


Figura 7 - Eficiência da biorremediação (%) do Fósforo e do Nitrogênio Inorgânico do efluente hidropônico pela *Chlorella vulgaris*, no decorrer dos sete dias de cultivo. Os valores expressos encontram-se no Anexo 7.

Com a aplicação da ficobiotecnologia empregando a microalga *C. vulgaris*, pode-se observar uma eficiente remoção, chegando a 80,54% ($182,425 \text{ mg.L}^{-1}$) de N-NO₃; 84,12% ($0,23 \text{ mg.L}^{-1}$) de N-NO₂; 82,18% ($21,92 \text{ mg.L}^{-1}$) de N-NH₃; e 51,90% ($18,167 \text{ mg.L}^{-1}$) de P-Total. Desta forma, ameniza consideravelmente a poluição causada no ambiente e se aproximando dos valores permitidos pelos dispositivos do CONAMA e do Ministério Público de Santa Catarina.

As porcentagens de biorremediação do N e do P encontradas no presente trabalho são corroboradas tanto por Méndez (2003), quando aponta que a remoção de N-NH₃, N-NO₃ de P-total pela *Chlorella* spp. em efluente doméstico atingiram respectivamente 69,82%; 61,45% e 61,68%. Como, também, por González *et al.* (1997), quando colocam que a *C. vulgaris* foi capaz de remover em torno de 55% de P-total do efluente de uma indústria de laticínios e de criação de suínos.

O crescimento da *C. vulgaris* nos distintos tratamentos controle e efluente hidropônico resultando na remoção das formas inorgânicas de Nitrogênio e Fósforo, apresentados nos Anexos 4 e 6 e 7 e Figuras 6 e 7 corroboram com a capacidade de incorporação dos distintos nutrientes pelas células das microalgas.

Neste trabalho, também foi avaliada a remoção de metais pesados presentes no EH, exceto Mo, tais como: Fe, Mn, Cu e Zn. Os resultados de suas concentrações médias estão demonstrados na Figura 8.

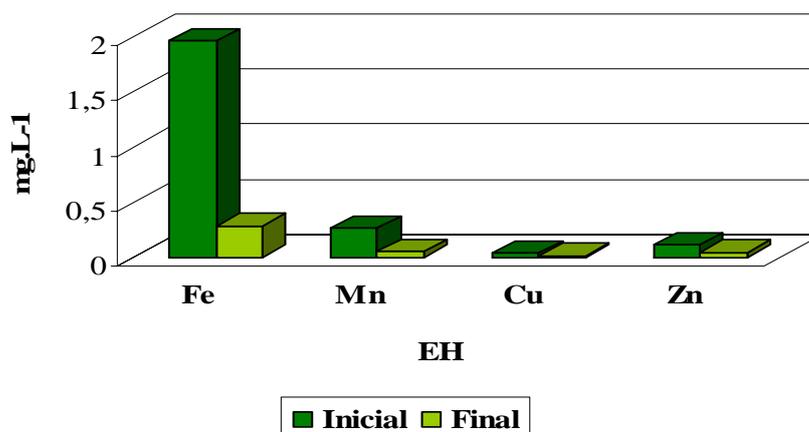


Figura 8 - Valores médios da concentração de metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) em meio efluente ao longo de sete dias. Valores encontrados no Anexo 8.

Os valores médios de biorremocão de metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) no período de sete dias de experimento estão representados na Figura 9.

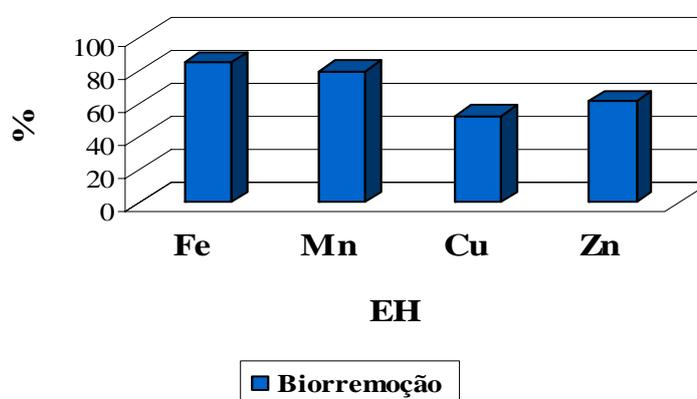


Figura 9 – Eficiência da biorremocão (%) de metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico através do uso da *Chlorella vulgaris*, no decorrer dos sete dias de crescimento celular. Valores encontrados no Anexo 9.

As concentrações de Fe, Mn, Cu e Zn encontradas no efluente hidropônico em mg.L⁻¹ são respectivamente: 1,949, 0,259, 0,004, 0,11. Estas concentrações não estão acima dos valores máximos permitido pelo CONAMA (Resolução 357/2005) de Fe, Mn, Cu e Zn (4,0 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹) presente em um efluente. No entanto, faz-se necessário a redução destes metais no efluente hidropônico, pelo fato de poderem causar sérios problemas para a vida

aquática, por serem acumulativos na cadeia trópica e produzirem efeitos tóxicos e mudanças teratogênicas em plantas, animais e seres humanos (incluindo câncer), eles também permanecem nos sedimentos e são lentamente liberados na água receptora final, conforme é colocado por Canizares-Villanueva e Travieso (1991).

As microalgas têm forte afinidade por metais polivalentes, devido o processo de biossorção (ILANGO VAN, 1992). Para Travieso *et al.* (2002), essa afinidade é basicamente devido à necessidade da presença de metais polivalentes em locais ativos de enzimas essenciais que são complexas nas vias metabólicas e pelos processos de biossorção e bioacumulação.

Os resultados apresentados na Figura 9, demonstraram que a *C. vulgaris* foi eficaz na biorremocção dos metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do efluente hidropônico, como tem sido demonstrado por Yan e Pan (2002), quando trabalharam com três espécies de microalgas, *C. pyrenoidosa*, *Closterium lunula* e *Scenedesmus obliquus*, para averiguar toxicidade e bioacumulação de Cu nas três espécies. Obtiveram assim, a remoção de Cu de 95%, 79% e 67% respectivamente, depois de 6 dias de exposição e por Travieso *et al.* (2002), quando estudaram a biorremocção de metais pesados de efluentes através do uso da microalga *S. obliquus* em um biorreator e obtiveram uma eficiência de remoção de 94,5% durante 11 dias de experimento. No presente trabalho a *C. vulgaris* removeu 52% de Cu, 85,22% de Fe, 79,54% de Mn e 60,91 de Zn, depois de 7 dias de cultivo, comprovando o potencial da microalga de bioacumulação de metais na sua parede celular, como é colocado por Travieso *et al.* (2002).

6. CONCLUSÕES

A microalga *C. vulgaris* adaptou-se eficientemente ao efluente hidropônico, como meio de cultura, demonstrando através da curva de crescimento o incremento da densidade celular, no decorrer dos 7 dias de cultivo. Entretanto, neste período de experimento, a microalga não conseguiu remover o suficiente de Nitrato e Fósforo-Total da solução hidropônica para atingir os valores mínimos permitidos pela legislação ambiental para o descarte no ambiente, como era o esperado.

Dessa forma, pode-se concluir que a ficobiorremocão através da *C. vulgaris* é uma boa alternativa de reciclagem para o efluente hidropônico, contudo, em relação a uma remoção mais eficaz do Nitrato e do Fósforo-Total neste trabalho, faz-se necessário tomar outras medidas para se alcançar os resultados esperados. Neste caso, uma possibilidade de melhoria na eficácia da biorremocão dessa alga, seria aumentar o período de experimento para mais dias, aonde a *C. vulgaris* apresentaria um maior consumo destes nutrientes.

Outra possibilidade para que a biorremocão pudesse ter sido totalmente eficiente, seria após a utilização da *C. vulgaris*, no período de sete dias de experimento, ter utilizado as macrófitas aquáticas *Lemna* ssp. e *Azolla* ssp. para remover o restante de Nitrato e Fósforo-Total ainda em excesso no efluente hidropônico.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da microalga *C. vulgaris* poderá ser associado às macrófitas aquáticas, como por exemplo, a *Lemna*, pois além de melhorar a biorremocão, poderá ajudar na flutuação da microalga, facilitando a separação da biomassa do efluente. Sugere-se, também pesquisar a possibilidade da utilização de macrófitas aquáticas como biorremovedoras de N, P e de metais pesados do efluente hidropônico.

Em estudos futuros, seria interessante e importante a dedicação e aprofundamento da aplicabilidade da biomassa algal, valorizando o processo e possibilitando alternativas de melhoria do solo, da alimentação, da saúde e de outras áreas diretamente envolvidas.

8. BIBLIOGRAFIA

ALDINGTON. T. **Urban and peri-urban agriculture: some thoughts on the issue.** Land Reform, Land Settlement and Co-operatives 2: 43-44 COAG/FAO (Comissão para Agricultura, FAO – Organização das Nações Unidas). 1999.

APHA, AWWA, WPCF (American Public Health Association, American Waterworks Association. Water Pollution Control Federation), 1998. Standart methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. 1105 pp. Washington, D.C.

ALVARADO, G.R.P.; FASANARO, R. Aguapés: Sua aplicação no tratamento biológico dos esgotos e na produção de energia alternativa. **Eng. Sanit.** v.19, n.1, p. 68-69

ALVES, L.C.; HENRIQUE. H.M.; XAVIER, A.M.; CAMMAROTA, M.C. Potential treatment alternative for laboratory effluents. **Bioresource Technology.** 96, 15, p.1650-1657. 2005.

ANAGA. A; ABU. G.O. *Chlorella vulgaris* and *Spirulina* Using Waste Effluent from a fertilizer Company in Nigeria. **Bioresource Technology.** 58, p. 93-95. 1996.

ANALYTICAL FOR ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY. Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, 1983.

ARMAR-KLEMESU, M. Urban agriculture and food security, nutrition and health. In: BAKKER, N.; DUBBELING, M.; GUNDEL, S.; SABEL-KOSCHELLA, U.; ZEEUW, H (Ed.). Growing cities, growing food: urban agriculture on the policy agenda. Feldafing: Deutsche sitffung für Internationale Entwicklung, 2000. p. 99-117.

ARORA, A.; SAXENA, S. Cultivation of *Azolla microphylla* biomass on secondary-treated Delhi municipal effluents. **Biomass & Bioenergy.** 29, 60-64. 2005.

AZEVEDO NETO, J. M. Novos conceitos sobre eutrofização. **Revista DAE,** v. 48, n. 151, 1988. 22–28.

AZOV, Y.; SHELEF, G.; MORAINÉ, R. Carbon limitation of biomass product in high rate oxidation ponds. **Biotechnol. And Bioengng.** 1982. 24, 579-594

AZOV, Y.; GOLDMAN, J.C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Appl. Environ. Microbiol.** 1982. 43, 735-739.

AYALA, F.; VARGAS, T. Experiments on Spirulina culture on waste-effluent media and at the pilot plant. **Hydrobiol.** 1987. 151, 91-93.

BELTRÃO, M. I. **Cultivo de algas Clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado.** 1992. 120f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Paulo, São Carlos, 1992.

BOGAN, R. H.; ALBERTSON, O. E.; PLUNTZE, J. C. Use of algae in removing phosphorus from sewage. **J. San. Engng. Dv., ASCE.** 1960. 86, 1-20.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. **Introduction to the Algae** – Structure and Reproduction. New Jersey. PRENTICE-HALL. 1985. 662p.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industrial.** São Paulo. CETESB. 1979. 764p.

BRANCO, S. M.; BERNARDES, R. S. Culturas hidropônicas como forma de remoção e reciclagem de nutrientes minerais dos efluentes de sistemas de tratamento de esgotos. **Revista DAE**, v. 134, 1983. p. 113-115

BRANCO, S. M.; BERNARDES, R.S.; MATHEUS, C.E. Produção de alimentos, aproveitamento energético e reciclagem de nutrientes em um sistema ecológico de tratamento de resíduos orgânicos. **Revista DAE**. v.45, n.143, p. 390-394. 1985.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O., MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F., ESPINOZA-CHÁVEZ, F. Acute toxicity to *Daphnia magna* of effluents containin Cd, Zn, and mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*. **Environ. Toxicol.** 15, p. 160-164. 2000.

CANIZARES-VILLANUEVA, R. O.; TRAVIESO, L. Microalgae immobilization for the treatment of wastewaters, **Report CONACYT, Project 8.07/91**, Program Cuba, Mexico, 1991.

____. Microalgae immobilization for the heavy metals removal, **Report CONACYT, Project 8.18/92**, Program Cuba, Mexico, 1992.

CASTELLANE, P. D.; ARAÚJO, J. A. **Cultivo sem solo**: hidroponia. Jaboticabal; FUNEP, 1994. 43p.

CASTELLANE, P. D.; ARAÚJO, J. A. **Cultivo sem solo**: hidroponia. Jaboticabal; FUNEP, 3ª edição, 1995. 43p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. No curso das atribuições que lhe confere o art.7, inciso IX, do Decreto 88.351, de 1º de junho de 1983, e o que estabelece a RESOLUÇÃO CONAMA Nº 003, de 5 de junho de 1984. Resolução CONAMA Nº 20, de 18 de junho de 1986. Disponível em: <lei.adv.Br/conama01.htm>. Acesso em 16 de julho de 2004.

____. Procedência: 6º reunião do GT revisão da Resolução 020/86, 22 de setembro de 2003. Processo nº 02000.002378/2002-43. Dispõe sobre alteração na Resolução 020/86, sobre a Classificação e Enquadramento de corpos de água. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/processos/c4297E2E/PropResol02086VersãofinaldoGT2209.doc>>. Acesso em: 05 de novembro de 2004.

____. Resolução nº 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 dá outras providências. O **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA**, no uso das competências que lhe são conferidas pelos arts. 60, inciso II e 80, inciso VII, da Lei no 6.938, de 31 de agosto de 1981, regulamentada pelo Decreto no 99.274, de 6 de junho de 1990 e suas alterações, tendo em vista o disposto em seu Regimento Interno. Disponível em: http://www.mma.gov.br/temp_indisponivel.html. Acesso em 05 de novembro de 2005.

COOPER, A **The ABC of NFT**. Narrabeen: Casper Publications Pty. 1996. 50p.

DAVIES, N. **The Aztecs**. Abacus, Londres, 1996. 363p.

DEELSTRA, T.; GIRARDET, H. Urban agriculture and sustainable cities. In: BAKKER, N.; DUBBERLING, M.; GÜNDEL, S.; SABEL-KOSCHELLA, U.; ZEEUW, H. (Ed). **Growing cities, growing food**: urban and agriculture on the policy agenda. Feldafing: Deutsche Sitffung für Internationale Entwicklung, 2000. p. 43-65.

DE LA NOÛE, J., BASSÉRES, A. Biotreatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. **Biol. Wastes**. 29, p.17-31.1989.

DIAS, J. A. B. Produção de plantas medicinais e agricultura urbana. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 140-143, 2000.

DOR, I.; SVI, B. Effect of heterotrophic bacteria on the green algae growing in wastewater. In: SHELEF, G. e SOEDER, C.J. (**Algae biomass: production and use**). Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. 852. 421-429.

DUFOSSÉ, L. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technolog.** 2005.16, 389-406.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro, Ed. Interciência/ FINEP, 1988, 575p.

FAO. **Urban agriculture: an oximoron?** In: The state of food and agriculture 1996 (Roma: FAO), 1996. p. 43-57.

FURLANI, P. R.; CASTELLANE, P. D. Estruturas para cultivo hidropônico. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.20, n.2000/2001, p. 72-80, set/dez. 1999a.

____. Nutrição mineral de hortaliças: preparo e manejo de soluções nutritivas. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.20, n.2000/2001, p. 90-98, set/dez. 1999b.

____. Cultivo de hortaliças folhosas em hidroponia em ambiente protegidos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.2000/2001, 1999. 99-104, set/dez.

FURLANI, P.R. **Informações sobre hidroponia** (mensagem pessoal). Mensagem recebida por pfurlani@iac.sp.gov.br em 20 de outubro de 2004.

GONZÁLEZ, L. E.; CAÑIZARES. 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**. 60: p. 259-262. 1997.

GUILLARD, R. L., Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Woods Hole, Oceanography Institution, Massachusetts.1973.

GUMBO D. J; NDIRIPO T. W. Open space cultivation in Zimbabwe: case study of Greater Harare, Zimbabwe. **African Urban Quaterly**. 11 (2-3): p. 210-216. 1996.

HARVEY, R. M.; FOX, J. L. Nutrient removal using *Lemna minor*. **J Water Poll. Control Fed.** 45, p. 1928-1938. 1973.

HOEK, C. van den.; MANN, D.G.; JAHNS, H.M. **Algae: an introduction to Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge. 1995. 623 p.

ILANGO VAN, K. Interaction of cadmium, copper and zinc in *Chlorella pyrenoidosa* chick, **Environ. Technol.** 13, p. 195–199.1992.

JEANFILS, J.; CANISIUS, M-F.; BURLION, N. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. **Journal of Applied Phycology.** 5: 369-374. 1993.

KNAUER, K., BEHRA, R., SIGG, L. Effects of free Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on growth and metal accumulation in fresh-water algae. **Environ. Toxicol. Chem.** 16 (2), p. 220–229. 1997.

LAU, P. S. TAM, N. F. Y.; WONG, Y.S.. Influence of organic-N source on an algal wastewater treatment system. **Resources, Conservation and Recycling.** 11, p. 197-208. 1994.

LEE, R. E. **Phycology**. 2nd e.d. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 645p.

LEE-SMITH D. African urban policy: issues and priority. **In: Documento apresentado na Conferência Internacional sobre Políticas para a Agricultura Periurbana no sul da África, Technikon, Pretória, 3-5 março/1998.** 1998.

LOSADA. H.; MARTINEZ. H.; VIEYRA, J.; PEALING, R. & CORTÉS, J. **Urban agriculture in the metropolitan zone of Mexico: changes over time in urban, sub-urban and peri-urban areas.** *Environment and Urbanization* 10 (2): 37-54. 1998.

LOURENÇO-LINDELL I. **Food for the poor, food for the city: the role of urban agriculture in Bissau.** Documento apresentado no Seminário da ODA sobre as implicações sociais e ambientais da agricultura urbana, Universidade do Zimbabwe, Harare, 30-31 agosto/1995. 1995.

MACHADO, A. T. Agricultura Urbana. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, n.636 p. 48-49, 2001.

MAYO, A. W.; NOIKE. T. Response of mixed culturas of *Chlorella vulgaris* e heterotrophic bacteria to varia of pH. **In: Pergamon. Wat. Sci. Tech.**. vol. 30. 8, 285-294. 1994.

MAXWELL D; ARMAR-KLEMESU M. Urban agriculture: introduction and review of literature. **Accra: Noguchi Memorial Institute for Medical Research.** 1998.

MANFRINATO, E. S. **Avaliação do método edafo-fitodepuração para tratamento preliminar de águas.** 1989. 100f . Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Paulo, Botucatu, 1989.

____. O aguapé – fatos e fofocas. **In: Problemas Ambientais Brasileiros, Fundação Salim Farah Maluf.** p. 109-112. 1991

MBIBA, B. Institutional responses to uncontrolled urban cultivation in Harare: prohibitive or accommodative? **Environment and Urbanization** 6 (1): 188-202. 1994.

MBIBA, B. **Urban agriculture policy in Southern Africa: from theory to practice.** In: Productive open space management with a shared focus on the potential of urban agriculture(urban food production) policy and Agenda 21. Minutas de documentos para uma Conferência Internacional, Pretória, 3-5 março/ 1998. 1998.

MARTINEZ, H. E. P. **Formulação de soluções nutritivas para cultivos hidropônicos comerciais.** Jaboticabal: FUNEP, 1997. 31p

MARTINEZ, H. E. P.; SILVA FILHO, J. B. **Introdução ao cultivo de hidroponia de plantas.** Viçosa, 1997. 52 p.

MARY, W. **Produção sazonal de cultivares de alface sob estrutura de proteção tipo túnel alto, em clima tropical, com dois tipos de cobertura morta.**1998. 85f. il.Dissertação (Mestrado) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1998.

MÉNDEZ, N. J. Evaluacion de la remoción de fosforo y nitrogenio de aguas residuales por el alga *Chlorella* ssp. **Revista Institucional de la Facultad de Salud.Colombia.** 2, p. 41-46. 2003.

MINISTÉRIO PÚBLICO DE SANTA CATARINA. DECRETO Nº 14.250, DE 5 DE JUNHO DE 1981. **Regulamenta dispositivos da Lei nº 5.793, de 15 de outubro de 1980, referentes à proteção e a melhoria da qualidade ambiental, artigo 19.**

MOUGEOT L. J. A. **For self-reliant cities: urban food production in a globalizing South.** In: Koc M, MacRae R, Mougeot LJA & Welsh J (eds), For hunger-proof cities: sustainable urban food systems (Ottawa: IDRC), 1999. p. 11-25.

_____. Urban Agriculture: definition, presence, potentials and risks. In: BAKKER, N.; DUBBELING, M.; GUNDEL, S.; SABEL-KOSCHELLA, U.; ZEEUW.H. (Ed.). Growing cities, growing food: urban agriculture on the policy agenda. Feldafing: Deutsche sitffung für Internationale Entwicklung, 2000. p. 1-42.

MOUSTIER P. La complémentarité entre agriculture urbaine et agriculture rurale. In: **Olanrewaju B Smith (ed.), Agriculture urbaine en Afrique de l'Ouest: une contribution à la sécurité alimentaire et à l'assainissement des villes (Wageningen: CTA / Ottawa: IDRC).** 1998.

MOUSTIER. P (ED.). Filières maraichères à Brazzaville: urban agriculturentification et observatoire pour l'action. Montpellier: **CIRAD - Agrisud International - Agricongo.** 1999.

OLGUÍN, E. J. **The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste.** Departament de Biotecnologia, Instituto de Ecologia, Mexico, 2000.

PANIANGUA, L. M. **El tecuitlatl, concentrado de algas *Spirullina* fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas.** México, 2003. p. 1-8.

PERSONA, R. EMPAER. **Estadual: Hidroponia é a solução na produção de hortaliças.** Disponível em: <[http:// www.Caceres.com.Br/index.php](http://www.Caceres.com.Br/index.php)>. Acesso em: 01 de novembro de 2004.

PILLAR, V.D.P. Multiv: aplicativo para análise multivariada e teste de hipóteses. Departamento de Ecologia da UFRGS, Porto Alegre, 2001.

POMPÊO, M. L. M. Culturas hidropônicas, uma alternativa não uma solução. . 8: 73-80. São Carlos, SP. **Anais Sem. Reg. Ecol.**, 1996.

POULIOT, Y., BUELNA, G., RACINE, C. & DE LA NOFIE, J. Culture of cyanobacteria for tertiary wastewater treatment and biomass production. **Biol. Wastes.** 29, p. 81-91. 1984.

RAVEN, P. H *et al.* **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, 5º Ed. Guanabara Koogan S. A. 1996. 728p.

____. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro, 6º Ed. Guanabara Koogan S. A. 2001. 906p.

RICHMOND, A. Cell response to environmental factors. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boca Raton, CRC Press Inc., 1986a. p. 69-99.

____. **Handbook of Microalgal Culture – Biotechnology and Applied Phycology**. Canadá, Blackwell Science Ltda a Blackwell Publishing company, 2004. 566p.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. Rio de Janeiro, 5º Ed. Guanabara Koogan S. A. 2003. 542p.

RODRIGUES, E. J. R. **Técnicas de cultivo e manejo da roseira em sistemas de cultivo sem solo**. Piracicaba, 1999. 84 f. Dissertação (Doutorado) – ESALQ/USP.

RODRIGUES, J. B. R.; BELLFILHO, P. **Eficiência do Crescimento da microalga *Chlorella minutissima* e sua aplicação em resíduos de suinocultura: valorização e tratamento**. Universidade Federal de São Carlos, 2000. 115p. Tese (Doutorado).

RODRIGUES, L. R. F. **Técnicas de cultivo hidropônico e de controle ambiental no manejo de pragas, doenças e nutrição vegetal em protegido**. Jaboticabal – SP: FUNEP. Ed. Afiliada. 2002. 761 p.

ROMITELLI, M. S. Remoção de fósforo em efluentes secundários com emprego de macrófitas aquáticas do gênero *Eichhornia*. **DAE**. 1983. 133, 66-68.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo, 1996a. 32, p. 154-172.

SIQUEIRA, A. **Microorganismos e processos biológicos: perspectiva ambiental**. Brasília - DF: EMBRAPA – SPI. 1994. 142 p

SMITH J.; RATTA. A.; NASSR, J. **Urban agriculture: food, jobs and sustainable cities.** Publication Series for Habitat II, Vol. I. Nova York: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (UNPD). 1996. 302 p.

SOLDO, D., BEHRA, R. Long-term effects of copper on the structure of fresh water eriphyton communities and tolerance to copper, zinc, nickel and silver. **Aquat. Toxicol.** 47, p.181–189. 2000.

SPOTING urban food marketing. **FAO Newsletter**, Rome 1999.

STAFF. H. Cultivos hidropônico. **Revista Brasileira de Agropecuária.** São Paulo, E. Escala. 1999. v.1, n.6, 87-89.

STANDART METHODS. For the Examination of water and wasterwater . Washington. 19° ed. Americam Public Health. Association/American Water Works Association/ Water Enviroment Federation Washington, 1995.

STOKES, P. M.. Heavy metal tolerance in algae isolated from lakes contaminated near Sudbury - Ontario – **Canadium Journal of Botany**., 51, p. 2155-2168. 1973.

TERBLANCE, A.P.S. Health hazard of nitrate in drinking water. **Water SA.** 1991. 17: p. 77-82.

TRAVIESO, L., PELLÓN, A.; BENÍTEZ, F. & SÁNCHEZ, E. BIOALGA reactor: preliminary studies for heave metals removal. **Elsevier. Biochemical Engineering Journal.** 2002. 12, 87-91.

____. Heavy metal removal by microalgae, Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** 1999. 62, p. 144–151.

TREVORS, J. T.; STRATDON, G. W.; GADD, G. M. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. Can. **J. Microbiol.** 1986. 32: p. 447-460.

TRIPATHI, B. D.; SHUKLA, S.C. Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants. **Environ. Poll.**, 1991. 69, p. 69-78.

THOMANN, R.V.; MUELLER, J.A., Principles of Surface Water Quality Modeling and Control, **Harper & Row Pub. Inc.**, Estados Unidos, 1987. 644p.

URBAN AND PERI-URBAN AGRICULTURE. COAG/99/10. Apresentado na 15ª Sessão da COAG, FAO, Roma, 25-29 janeiro/1999.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, DG.; JAHNS, HM. **An Introduction to Phycology**. Cambridge University Press, United Kingdom, 627 p. 1995.

VALLENTYNE, J. R. **Introducción a la Limnología**: Los lagos y el lombre. Ediciones Omega, Barcelona, 1978. 169p

VON SPERLING. M. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgostos**. Belo Horizonte: Departamento de engenharia Sanitária Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais. 2º Ed. 1998. 243p.

WALDENSTEDT, L. INBORR, J.; HANSON, I. & ELWINGER, K. Effects of astaxanthin-rich algal meal (*Haematococcus pluvalis*) on growth performance, caecal campylobacter and clostridial counts and tissue astaxanthin concentration of broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**. 108, 119-132. 2003.

VALDERRAMA, L. T.; DEL CAMPO, C. M.; RODRIGUEZ, C. M. Treatment of recalcitrant wasterwater from ethanol and citric acid producing using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. **Water Research** , vol. 36, 4185- 4192. 2002.

YAN, H; PAN, G. Toxicity and bioaccumulation of cooper I three green microalgal species. **Chemosphere**. 49, p. 471-476. 2002.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Cultivo hidropônico (Sistema NFT ou Técnica do fluxo laminar de nutrientes)
- Labhidro (Laboratório de Agricultura Irrigada e Hidroponia) – UFSC - Florianópolis/2005



Calhas de cultivo (canais de cultivo)

Sistema de bombeamento

Anexo 2 - Cultivo hidropônico (Sistema NFT ou Técnica do fluxo laminar de nutrientes) - Labhidro (Laboratório de Agricultura Irrigada e Hidroponia) – UFSC – Florianópolis/2005



Calhas de cultivo (canais de cultivo)

Sistema de bombeamento

Anexo 3 – Reservatório da solução nutritiva hidropônica. Labhidro (Laboratório de Agricultura Irrigada e Hidroponia) – UFSC – Florianópolis/2005



Tanque de solução nutritiva

Solução nutritiva

Sistemas de retorno ao tanque

Anexo 4 – Contagem das células em $\text{cells.mL}^{-1} \times 10^4$ da *Chlorella vulgaris* do meio BBM do EH nos 7 dias de crescimento celular

Tempo (Dias)	BBM	R1	R2	R3	R4	Média (cells.mL⁻¹ X10⁻⁴)
0		10	10	10	10	10
1		34.86	21.27	20.96	20.64	24.43
2		90.73	87.47	79.35	88.68	86.56
3		231.27	209.76	235.16	258.66	233.71
4		785.60	756.9	683.4	846	767.97
5		-----	726.45	907.8	966	867
6		930	910.3	837.5	1002	920
7		1025.88	1109.25	770.1	1326	1057.81

Tempo (Dias)	EH	R1	R2	R3	R4	Média (cells.mL⁻¹ X10⁻⁴)
0		10	10	10	10	10
1		18.74	15.43	27.85	27.30	22.33
2		48.01	72.48	66	54.97	60.36
3		180.56	113.76	135.66	156.25	146.56
4		267.88	191.77	292.05	259.88	252.90
5		663.04	474.14	518.1	373.8	507.27
6		583.12	561.72	544.5	427.2	529.13
7		701.52	504.34	600.6	484.16	572.65

Anexo 5 - Valores médios da contagem de células ($\text{cells.mL}^{-1} \times 10^4$) da *Chlorella vulgaris* cultivada em BBM e em efluente hidropônico, no decorrer dos 7 dias de crescimento celular, em Janeiro de 2005

Tempo (Dias)	Média BBM T (cells.mL⁻¹x10⁴)	Média EH (cells.mL⁻¹x10⁴)	Probabilidade Estatística (Valor de P)
0	10 ⁰	10 ⁰	Não significativo
1	24 ⁰	22 ⁰	Não significativo
2	87 ⁰	60 ^a	0,0278
3	234 ⁰	147 ^a	0,0276
4	768 ⁰	253 ^a	0,0304
5	867 ⁰	507 ^a	0,0545
6	920 ⁰	529 ^a	0,0274
7	1058 ⁰	573 ^a	0,0301
Média Total	496 ⁰	263 ^a	0,013

H0: Não existe diferença no crescimento celular no decorrer do tempo;
Ha: Existe diferença do crescimento celular no decorrer do tempo.

Anexo 6 – Valores médios da remoção em mg.L^{-1} de N-NH_3 , NO_3 E NO_2 do EH

ENSAIO FÍSICO-QUÍMICOS							
EH- 100%							
	R1	R2	R3	R4	Média (mg.L^{-1})	Desvio padrão	
Amônia inicial	26,5	26,5	27	..		26,7	0,3
Amônia final	4,8	4,5	4,7	5		4,8	0,2
Nitrato inicial	224,5	--	--	228,5		226,5	2,8
Nitrato final	43	42,6	46,2	44,5		44,08	1,6
Nitrito inicial	0,26	0,26	0,29	0,27		0,3	0,01
Nitrito final	0,05	0,04	0,04	0,04		0,04	0,005
P-Total inicial	35,03	34,95	34,88	35,1		34,99	0,09
P-Total final	16,02	16,9	17,17	17,2		16,8	0,5

Anexo 7 - Valores médios em mg.L^{-1} e (%) da biorremoção de Fósforo e Nitrogênio Inorgânico do efluente hidropônico pela *Chlorella vulgaris*

Tratamento	Variáveis	Valores de remoção	
		mg.L^{-1}	% de Remoção
EH	N-NH ₃	21,92	82,18
	P-Total	18,167	51,90
	N-NO ₃	182,425	80,54
	N-NO ₂	0,23	84,18

Anexo 8 – Valores médios de remoção em de metais pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do EH

ENSAIO FÍSICO-QUÍMICOS

T1- 100%						
Início do cultivo						
Metais	R1	R2	R3	R4	Média mg.L ⁻¹	Desvio padrão
Fe	1,929	1,978	1,94	1,95	1,949	0,021
Mn	0,254	0,262	0,258	0,26	0,259	0,003
Cu	0,036	0,047	0,039	0,038	0,04	0,005
Zn	0,097	0,137	0,099	0,105	0,110	0,019
Final do cultivo						
Metais	R1	R2	R3	R4	Média mg.L ⁻¹	Desvio padrão
Fe	0,272	0,298	0,28	0,303	0,288	0,015
Mn	0,071	0,038	0,056	0,046	0,053	0,014
Cu	0,022	0,019	0,017	0,018	0,019	0,002
Zn	0,042	0,04	0,039	0,051	0,043	0,005

Anexo 9 - Valores médios em mg.L⁻¹ e (%) da biorremoção de Fe, Mn, Cu e Zn do efluente hidropônico pela *Chlorella vulgaris*

Tratamento	Variáveis	Valores de remoção	
		mg.L ⁻¹	% de Remoção
EH	Fe	1,661	85,22
	Mn	0,206	79,54
	Cu	0,021	85,22
	Zn	0,067	60,91

Anexo 10 – Potencial Hidrogeônico (pH) do meio de cultivo BBM e do efluente hidropônico, durante os 7 dias de crescimento da *Chlorella vulgaris*

pH									
T1- EH	T - BBM								
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	
T0	5,00	5,00	5,00	5,00	6,8	6,8	6,8	6,8	
T1	5,0	5,03	5,06	5,13	6,6	6,5	6,8	6,4	
T2	4,71	4,74	4,92	4,85	6,44	6,44	6,56	6,56	
T3	5,56	5,52	5,43	5,43	6,40	6,59	6,59	6,63	
T4	5,20	5,08	5,02	5,00	7,04	7,02	6,93	7,03	
T5	5,30	5,30	5,30	5,23	7,16	7,22	7,10	7,11	
T6	5,30	5,30	5,30	5,30	8,8	8,7	8,8	8,8	

Anexo 11 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 1

MULTIV version 2.3.17

RESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 1 seconds

Number of iterations (random permutations): 10000

Random number generation initializer: 970692063

Group partition of sampling units:

Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8

Factor Tempo_1:

Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2

Order of groups in contrasts: 1 2

Source of variation Sum of squares(Q) P(QbNULL>=Qb)

 Tempo_0:

Between groups 8.841 0.6951

Contrasts:

1 -1	8.841	0.6837
Within groups	260.84	

Total 269.69

Mean vectors of each group:
Factor Tempo_0:
Group 1 (n=4): 24.432
Group 2 (n=4): 22.33

Analysis status:
Dimensions: 8 sampling units, 1 variables
Data type: (1) quantitative, same measurement scales
Scalar transformation: (0)none
Vector transformation: (0)none
Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
Session IS saved.

Anexo 12 - Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 2

ULTIV version 2.3.17

RESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:
Dimensions: 8 sampling units, 1 variables
Data type: (1) quantitative, same measurement scales
Scalar transformation: (0)none
Vector transformation: (0)none
Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 1 seconds
Number of iterations (random permutations): 10000
Random number generation initializer: 970692442
Group partition of sampling units:
Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8
Factor Tempo_2:
Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2
Order of groups in contrasts: 1 2
Source of variation Sum of squares(Q) P(QbNULL>=Qb)

Tempo_2:		
Between groups	1372.1	0.0264
Contrasts:		
1 -1	1372.1	0.0278

Within groups 434.97

Total 1807.1

Mean vectors of each group:

Factor Tempo_2:

Group 1 (n=4): 86.558

Group 2 (n=4): 60.365

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

Anexo 13 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 3

ESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 2 seconds

Number of iterations (random permutations): 10000

Random number generation initializer: 970692757

Group partition of sampling units:

Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8

Factor Tempo_3:

Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2

Order of groups in contrasts: 1 2

Source of variation	Sum of squares(Q)	P(QbNULL>=Qb)
<hr/>		
Tempo_3:		
Between groups	15192	0.0277
Contrasts:		
1 -1	15192	0.0276
Within groups	3648.7	
<hr/>		
Total	18841	

Mean vectors of each group:

Factor Tempo_3:

Group 1 (n=4): 233.71

Group 2 (n=4): 146.56

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

Anexo 14 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 4

ESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 2 seconds

Number of iterations (random permutations): 10000

Random number generation initializer: 970693163

Group partition of sampling units:

Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8

Factor Fator_4:

Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2

Order of groups in contrasts: 1 2

Source of variation	Sum of squares(Q)	P(QbNULL>=Qb)

Fator_4:		
Between groups	5.3061e+05	0.0282
Contrasts:		
1 -1	5.3061e+05	0.0304
Within groups	19217	

Total	5.4983e+05	

Fator_4:

Between groups 5.3061e+05 0.0282

Contrasts:

1 -1 5.3061e+05 0.0304

Within groups 19217

Total 5.4983e+05

Mean vectors of each group:

Factor Fator_4:

Group 1 (n=4): 767.98

Group 2 (n=4): 252.9
 Analysis status:
 Dimensions: 8 sampling units, 1 variables
 Data type: (1) quantitative, same measurement scales
 Scalar transformation: (0)none
 Vector transformation: (0)none
 Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
 Session IS saved.

Anexo 15 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 5

MULTIV version 2.3.17

 RESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:
 Dimensions: 7 sampling units, 1 variables
 Data type: (1) quantitative, same measurement scales
 Scalar transformation: (0)none
 Vector transformation: (0)none
 Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
 Session IS saved.

 RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 1 seconds
 Number of iterations (random permutations): 10000
 Random number generation initializer: 970698956
 Group partition of sampling units:
 Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7
 Factor Tempo_5:
 Groups: 1 1 1 2 2 2 2
 Order of groups in contrasts: 1 2
 Source of variation Sum of squares(Q) P(QbNULL>=Qb)

 Tempo_5:

Between groups	2.2153e+05	0.0545
Contrasts:		
1 -1	2.2153e+05	0.0557
Within groups	74513	

Total 2.9604e+05
 Mean vectors of each group:
 Factor Tempo_5:
 Group 1 (n=3): 866.75
 Group 2 (n=4): 507.27

Analysis status:

Dimensions: 7 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

Anexo 16 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 6

RESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 2 seconds

Number of iterations (random permutations): 10000

Random number generation initializer: 970699171

Group partition of sampling units:

Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8

Factor Tempo_6:

Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2

Order of groups in contrasts: 1 2

Source of variation	Sum of squares(Q)	P(QbNULL>=Qb)
---------------------	-------------------	---------------

Tempo_6:

Between groups	3.0547e+05	0.0265
----------------	------------	--------

Contrasts:

1 -1	3.0547e+05	0.0274
------	------------	--------

Within groups	28327	
---------------	-------	--

Total	3.338e+05	
-------	-----------	--

Mean vectors of each group:

Factor Tempo_6:

Group 1 (n=4): 919.95

Group 2 (n=4): 529.13

Analysis status:

Dimensions: 8 sampling units, 1 variables

Data type: (1) quantitative, same measurement scales
 Scalar transformation: (0)none
 Vector transformation: (0)none
 Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
 Session IS saved.

Anexo 17 – Testes de aleatorização do programa MULTIV (PILLAR, 2001), para valores do crescimento celular dos tratamentos: BBM (grupo 1) e EH (grupo 2), no tempo 7

RESEMBLANCE MEASURES

Analysis status:
 Dimensions: 8 sampling units, 1 variables
 Data type: (1) quantitative, same measurement scales
 Scalar transformation: (0)none
 Vector transformation: (0)none
 Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units
 Session IS saved.

RANDOMIZATION TEST

Elapsed time: 3 seconds
 Number of iterations (random permutations): 10000
 Random number generation initializer: 970699338
 Group partition of sampling units:
 Sampling units: 1 2 3 4 5 6 7 8
 Factor Tempo_7:
 Groups: 1 1 1 1 2 2 2 2
 Order of groups in contrasts: 1 2
 Source of variation Sum of squares(Q) P(QbNULL>=Qb)

Tempo_7:		
Between groups	4.7075e+05	0.0277
Contrasts:		
1 -1	4.7075e+05	0.0301
Within groups	1.8825e+05	

Total 6.59e+05

Mean vectors of each group:

Factor Tempo_7:
 Group 1 (n=4): 1057.8
 Group 2 (n=4): 572.65

Analysis status:
 Dimensions: 8 sampling units, 1 variables
 Data type: (1) quantitative, same measurement scales
 Scalar transformation: (0)none

Data type: (1) quantitative, same measurement scales

Scalar transformation: (0)none

Vector transformation: (0)none

Resemblance measure: (3)Euclidean distance, (1)between sampling units

Session IS saved.