

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA**  
**DE ALIMENTOS**

**Luana Paula Vendruscolo**

**Cultivo de microalgas com efluente de maltaria para obtenção de  
biocombustíveis**

**Passo Fundo**

**2016**



**Luana Paula Vendruscolo**

**Cultivo de microalgas com efluente de maltaria para obtenção de biocombustíveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob orientação do prof. Dr. Marcelo Hemkemeier e co-orientação da prof. Dra. Luciane Maria Colla.

**Passo Fundo  
2016**



**Luana Paula Vendruscolo**

**Cultivo de microalgas com efluente de maltaria para obtenção de biocombustíveis**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob orientação do prof. Dr. Marcelo Hemkemeier e co-orientação da prof. Dra. Luciane Maria Colla.

Data da defesa: 08 de abril de 2016.

Componentes da banca examinadora:

---

Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier  
Orientador – Universidade de Passo Fundo - UPF

---

Prof. Dra. Luciane Maria Colla  
Co-orientadora – Universidade de Passo Fundo - UPF

---

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG

---

Prof. Dra. Erika Cristina Francisco  
Universidade de Passo Fundo - UPF

CIP – Catalogação na Publicação

---

V453c Vendruscolo, Luana Paula  
Cultivo de microalgas com efluente de maltaria para  
obtenção de biocombustíveis / Luana Paula Vendruscolo. –  
2016.  
79 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier.  
Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Energia da biomassa. 2. Biocombustíveis. 3. Alga -  
Cultura e meios de cultura. 4. Águas residuais. 5. Resíduos  
industriais. I. Hemkemeier, Marcelo, orientador. II. Colla,  
Luciane Maria, coorientadora. III. Título.

CDU: 620.91

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

Dedico este trabalho à minha inspiração, meu  
noivo Júnior.





## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pelas pessoas que tenho ao meu lado.

Ao meu noivo Júnior, por ser um exemplo, por me encantar com toda sua inteligência e por todo amor e dedicação que tem a mim.

Aos meus pais, por me apoiarem e me presentear com algo tão maravilhoso que é a educação.

Ao meu orientador, professor Marcelo Hemkemeier, por acreditar no meu potencial, por todo conhecimento repassado e por ser um exemplo de profissional.

À minha querida co-orientadora, professora Luciane Maria Colla, por toda dedicação e atenção a este trabalho.

À Ana Cláudia Freitas Margarites, pela colaboração e pelas inúmeras conversas rápidas durante todo período de experimentos.

À aluna do Curso de Engenharia Ambiental, Francine Sossella, pela parceria e presença tão agradável durante os experimentos.

À minha querida amiga e companheira de graduação e mestrado, Éllen Francine Rodrigues, pela parceria, apoio, por todas as conversas e principalmente por todas as risadas e acreditar junto que tudo daria certo.

À todos os meu colegas do Laboratório de Fermentações, pela companhia diária e amizade. Sentirei falta deste lugar.

Aos técnicos dos laboratórios, João, Marilda, e principalmente à Clarice, por rir e me ouvir falar durante horas e horas.

À Fapergs (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Jorge Alberto Vieira Costa, pelas microalgas cedidas para realização deste trabalho.

À maltaria, pela disponibilidade das coletas do efluente utilizado neste trabalho.

À Universidade de Passo Fundo pelo incentivo à pesquisa.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, por apoiar a pesquisa e dedicarem seu tempo a nos ensinar.

À todos que de alguma forma contribuíram pra que este trabalho fosse realizado, meu muito obrigada!



*“Si tu linquis, ei vincunt.”*

*Sol Invictus*

*“Ubi dubim ibi libertas.”*

*Provérbio Letão*

*“Nenhum homem pode atravessar o mesmo rio duas vezes, porque nem o homem nem o rio são os mesmos.”*

*Heráclito*

*“Duvide de tudo. Ache sua própria luz.”*

*Gotama Buddha*



## RESUMO

Na produção de malte são gerados efluentes líquidos com concentrações de fosfato e nitrato, que mesmo após o tratamento biológico de efluente, necessitam de tratamento físico-químico a fim de tornar o efluente passível de ser descarregado nos corpos hídricos. Caso contrário, estas substâncias podem ocasionar o fenômeno de eutrofização. O tratamento físico-químico, por sua vez, além de apresentar custo elevado, pode causar contaminações em leitos de rios com residuais de coagulantes químicos, alterando a qualidade da água do corpo receptor. Os processos biológicos apresentam características apropriadas para auxiliar no combate à poluição, tornando os microrganismos objetos de diversos estudos e pesquisas. O uso de microalgas no tratamento de efluentes é uma alternativa viável do ponto de vista econômico em relação aos sistemas convencionais secundários e terciários. Os cultivos microalgais podem ser utilizados para a remoção de nitrogênio e fósforo de efluentes, agregando valor ao processo pela possibilidade de utilização da biomassa microalgal obtida para outras finalidades, como por exemplo, para a produção de biocombustíveis. O objetivo do trabalho foi utilizar efluente de maltaria no cultivo de microalgas, a fim de aumentar as produtividades em carboidratos e/ou lipídios da biomassa microalgal, proporcionando a remoção de poluentes, através da utilização destes como fonte nutricional para as microalgas. O efluente tratado por processo biológico da maltaria foi submetido à caracterização físico-química, identificando-se as concentrações presentes, principalmente dos compostos nitrogenados e fosfatados, mostrando que as concentrações de fosfato são consideradas altas em termos de legislação e que após ajustes nas concentrações de nitrogênio, o mesmo apresenta-se promissor no fornecimento de nutrientes para microalgas. Para a seleção de microalgas, foram utilizadas microalgas dos gêneros *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Synechococcus*. Com adição de 30% do efluente de maltaria nos cultivos, as concentrações de carboidratos aumentaram atingindo valores de 30,07% para *Spirulina platensis* LEB 52, 24,67% para *Spirulina platensis* Paracas, 25,50% para *Scenedesmus obliquus*, 48,93% para *Chlorella homosphaera*, 26,38% para *Chlorella minutissima* e 49,86% para *Synechococcus nidulans*. Apesar das altas concentrações de carboidratos na biomassa das microalgas *Chlorella homosphaera* e *Synechococcus nidulans*, as maiores produtividades em carboidratos foram obtidas pelas microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 (27,05 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e *Spirulina platensis* Paracas (20,77 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). O cultivo de microalgas foi eficiente na remoção dos compostos nitrogenados e fosfatados do efluente de maltaria, atingindo níveis de remoção de até 93,13% para nitrato e 89,76% para fosfato. A utilização de 50% de efluente no cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52, em tanque tipo *raceway pond*, apresentou-se eficiente na remoção de nitrato e fosfato, porém com concentração celular menor e produtividade de carboidratos (12,26 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) também menor, quando utilizado 30% do efluente. Pode-se concluir, que a utilização de efluente de maltaria no cultivo de microalgas, é uma alternativa viável para a redução de custos com o meio de cultivo, assim como, a utilização de microalgas na remoção de compostos nitrogenados e fosfatados é uma alternativa aos tratamentos convencionais para remoção destes poluentes. O trabalho possibilita agregar valor a um efluente através da redução de custos de produção de biocombustíveis de microalgas.

Palavras-chave: Água residuária. Biodiesel. Bioetanol. Microalga.



## ABSTRACT

The production of malt generates wastewater with phosphate and nitrogen concentrations, which even after biological treatment, need physical-chemical treatment to render it possible for the effluent to be discharged into bodies of water. Otherwise, these substances could cause the eutrophication phenomenon. The physical-chemical treatment, besides having a high cost, can cause the contamination of riverbeds with residual chemical coagulants, altering the quality of the receiving body of water. Biological processes have appropriate characteristics to help fight pollution, such that there are various studies and research on the microorganisms. The use of microalgae in wastewater treatment is a viable alternative from an economic point of view compared to conventional secondary and tertiary systems. The microalgae cultures can be used for removing nitrogen and phosphorus from wastewater, adding value to the process due the possibility of using the obtained microalgae biomass for other purposes, for example in the production of biofuels. The objective of this work was to use malthouse wastewater in the cultivation of microalgae, in order to increase productivity in carbohydrates and/or lipid of microalgae biomass, providing the removal of pollutants through the use of these as nutritional source. The biologically treated wastewater of the malthouse was subjected to physicochemical characterization, identifying the levels of mainly of nitrogen and phosphorous compounds. The phosphate concentrations are legally high and after some adjustments in the nitrogen levels, it appears promising in the supply of nutrients. For selection of microalgae were used of microalgae *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus* and *Synechococcus*. After the addition of 30% of the malthouse in the wastewater the concentrations levels of carbohydrate increased reaching 30,07% for *Spirulina platensis* LEB 52, 24,67% for *Spirulina platensis* Paracas, 25,50% for *Scenedesmus obliquus*, 48,93% to *Chlorella homosphaera*, 26,38% to *Chlorella minutissima* and 49,86% to *Synechococcus nidulans*. Despite the high concentrations of carbohydrates in biomass of microalgae *Chlorella homosphaera* and *Synechococcus nidulans*, the highest productivity in carbohydrates were obtained by microalgae *Spirulina platensis* LEB 52 (27,05 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) and *Spirulina platensis* Paracas (20,77 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). The cultivation of microalgae was efficient in the removal of nitrogen and phosphorous compounds from the wastewater of malt house, reaching levels of up to 93,13% removal to 89,76% nitrate and phosphate. The use of 50% of effluent in the cultivation of microalgae *Spirulina platensis* LEB 52, in a tank raceway type were efficient on the removal of nitrate and phosphate, although with smaller cell concentration and productivity of carbohydrate (12,26 mg.L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) also lower when used 30% of the wastewater. In conclusion, the use of malthouse wastewater in the cultivation of microalgae is a viable alternative for cost reduction for the growth medium, as well as the use of microalgae in the removal of nitrogen and phosphorous compounds as an alternative to conventional treatments for removal of pollutants. The process also makes it possible to add value to an effluent through the reduction of production costs of biofuels from microalgae.

Keywords: Biodiesel. Bioethanol. Microalgae. Wastewater.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral de produção de biocombustíveis de microalgas. ....	34
Figura 2 – Estufa termostatizada utilizada na seleção das microalgas. ....	37
Figura 3 – Tanque tipo <i>raceway</i> para aumento de escala no cultivo da microalga selecionada.....	38
Figura 4 - Curvas de crescimento das microalgas estudadas (a) e determinação de pH ao longo dos cultivos (b).....	46
Figura 5 - Remoção de nitrato e fosfato de efluente de maltaria através do cultivo de microalgas.....	52
Figura 6 - Curva de crescimento da microalga <i>S. platensis</i> LEB 52 (■), remoção de nitrato (▲), remoção de fosfato (●).....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores máximos de emissão de DBO <sub>5</sub> , DQO e Sólidos Suspensos (SS)...	28
Tabela 2 - Padrões de emissão para os parâmetros NTK e Fósforo. ....	28
Tabela 3 - Composição química das microalgas. ....	30
Tabela 4 - Metodologia analítica para caracterização do efluente.....	36
Tabela 5: Caracterização do efluente de maltaria tratado por processos biológicos (Reator anaeróbio + lodos ativados). ....	42
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos e caracterização da biomassa das microalgas estudadas durante a seleção. ....	50
Tabela 7 - Concentrações de nitrato e fosfato no primeiro e último dia de cultivo para cada microalga estudada na seleção. ....	51
Tabela 8 – Concentrações de nitrato e fosfato no cultivo da microalga em tanque <i>raceway</i> .....	55
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos de cultivo. ....	56
Tabela 10 - Composição bioquímica da biomassa microalgal, produtividades em carboidratos e lipídio do cultivo em tanque tipo <i>raceway</i> .....	57



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1 GERAÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS .....	23
2.1.1 Efluente de maltarias .....	24
2.1.2 Tratamento de efluentes .....	25
2.1.3 Legislação ambiental .....	27
2.2 MICROALGAS .....	28
2.2.1 Aplicações biotecnológicas das microalgas .....	30
2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS .....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1 LOCAL DE ESTUDO .....	35
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS .....	35
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE .....	35
3.4 ADAPTAÇÃO DOS CULTIVOS AO EFLUENTE .....	36
3.5 SELEÇÃO DE MICROALGAS .....	36
3.6 AUMENTO DE ESCALA DOS CULTIVOS .....	38
3.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DURANTE O CULTIVO DE MICROALGAS .....	39
3.7.1 Crescimento celular .....	39
3.7.2 pH .....	39
3.7.3 Determinação de carboidratos .....	39
3.7.4 Determinação de proteínas .....	40
3.7.5 Determinação de lipídios .....	40
3.7.6 Nitrato e fosfato .....	40
3.7.7 Umidade .....	40
3.8 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE .....	42
4.2 SELEÇÃO DE MICROALGAS .....	46
4.2.1 Crescimento celular e composição bioquímica da biomassa .....	46
4.2.2 Remoção de nitrato e fosfato .....	51
4.3 AUMENTO DE ESCALA DA MICROALGA SELECIONADA .....	55

5 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO A – Meio Zarrouk.....	77
ANEXO B – Meio Bristol’S Modificado (MBM) .....	78
ANEXO C – Meio BG-11 .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

O lançamento de efluentes industriais em corpos hídricos pode causar impactos ambientais quando estes são lançados sem tratamento adequado. Os nutrientes presentes no efluente podem causar alterações severas no ecossistema, e apresentar riscos para a saúde. Os efluentes que apresentam elevadas concentrações de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo podem ser utilizados no cultivo de microalgas, visto que estas têm a capacidade de utilizar os nutrientes presentes no efluente para se desenvolver.

Segundo Venkataraman et al. (1982), os efluentes agroindustriais podem ser eficientemente utilizados pelas microalgas, sem o uso de nutrientes adicionais para o seu crescimento. As microalgas, através da remoção de nitrogênio e fósforo das águas residuais, podem auxiliar na redução de problemas ambientais, como a eutrofização de ambientes aquáticos (RUIZ et al., 2011; OLGUÍN, 2003).

O fenômeno de crescimento das microalgas em efluentes já foi amplamente estudado por vários autores, quer em efluente municipal (GRIFFITHS, 2010), resultante da atividade agropecuária (RODRIGUES; FILHO, 2004), de indústria de laticínios (WOERTZ et al., 2009), de destilaria (TRAVIESO et al., 2008), entre outros, tendo a conclusão comum sido que, enquanto crescem, as microalgas removem alguns contaminantes, provocando o tratamento dos efluentes.

A utilização de águas residuárias como meio alternativo pode ser uma forma de diminuir os custos na produção de microalgas, o que agrega o conceito de reuso da água e produção de biomassa com valor de mercado aos sistemas de tratamento de efluentes (PITTMAN et al., 2011).

Os biocombustíveis são uma alternativa atraente aos combustíveis à base de petróleo, visto que estes podem ser utilizados como combustíveis para o transporte com pouca mudança nas tecnologias atuais e têm um potencial significativo para melhorar a sustentabilidade e reduzir as emissões de gases de efeito estufa. Os biocombustíveis líquidos (bioetanol, biodiesel), combustíveis gasosos (metano ou hidrogênio) são derivados de materiais orgânicos, tais como amido, oleaginosas ou celulose.

Em meados dos anos 1970, com a crise do petróleo, o Brasil incorporou o bioetanol em sua matriz energética. Atualmente é o segundo maior produtor mundial de bioetanol, utilizando como matéria-prima, a cana-de-açúcar. A fim de incentivar a utilização de biocombustíveis, alguns países criaram estratégias, tais como metas obrigatórias da inserção

dos biocombustíveis na matriz energética, bem como incentivos financeiros, redução de impostos, isenção e subsídios. Além disso, os governos podem intervir na cadeia de produção, apoiando algumas culturas como matéria-prima, subsidiando fatores específicos de produção, com a concessão de incentivos ou a criação de tarifas de importação (SORDA et al., 2010).

A utilização de culturas alimentares para a produção de biocombustíveis acaba por gerar uma preocupação com a produção de alimentos, já que estes podem competir por terras adequadas para o cultivo provocando um aumento no preço dos alimentos.

Desde 1999 houve uma elevação suave, mas continuada do valor do petróleo, principalmente devido ao aumento do consumo ocasionado pela expansão industrial e econômica dos tigres asiáticos e da Índia. A Índia, a China e outros países da Ásia consumiam em 1995 apenas 2 milhões de toneladas de petróleo (30% do consumo mundial na época) e em 2006 consumiam 6 milhões de toneladas (mais da metade do consumo mundial (TROSTLE, 2008)). Estas análises fizeram com que grandes potências mundiais percebessem que o preço do petróleo continuaria aumentando e procuraram no bioetanol uma alternativa para o combustível líquido. Sorda et al. (2010) afirmam que a produção de biocombustíveis a partir de culturas alimentares pode ser o motivo para o aumento dos preços dos alimentos, sendo que no ano de 2006, 20% do milho dos EUA foi destinado para a produção de bioetanol.

Nos últimos anos, tem-se estudado o potencial de utilização de biomassa microalgal para a produção de biocombustíveis, com o uso de água não potável, efluentes industriais ricos em nitrogênio e fósforo como fonte de nutrientes e diminuição nos custos de produção.

Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi apresentar uma alternativa à obtenção de biomassa para a produção de biocombustíveis, a partir de cultivos microalgais utilizando efluente como fonte nutricional.

Os objetivos específicos foram:

- a) Apresentar uma alternativa ao tratamento físico-químico de efluente de maltaria;
- b) Selecionar microalgas capazes de remover nitrato e fosfato presentes em efluente de maltaria tratado por processo biológico;
- c) Avaliar, através da composição química das biomassas cultivadas, qual microalga apresenta potencial na obtenção de biomassa para produção de bioetanol;
- d) Cultivar a microalga selecionada em tanque *raceway*, para aumento de escala a fim de obter elevadas concentrações de carboidratos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GERAÇÃO DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

As atividades que envolvem a utilização de água acabam por gerar efluentes que na maioria das vezes são lançados no meio ambiente (MIERZWA; HESPANHOL, 2005; METCALF; EDDY, 2003).

O potencial de poluição de águas residuais é diretamente proporcional à concentração dos seus componentes poluentes. A caracterização física, química e biológica dos efluentes, torna possível estabelecer o sistema de tratamento necessário para assegurar a viabilidade da água para reutilização ou para evitar a degradação das águas receptoras quando do descarte (GUTTERRES; AQUIM, 2012).

O setor industrial consome aproximadamente 23% da demanda total de água captada destinada a atender os diversos usos consuntivos, segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2012). É, também, responsável pelo descarte de um volume considerável de efluentes, induzindo à preocupação quanto ao tratamento e destino final dos efluentes e aos possíveis impactos relacionados aos seus despejos no meio ambiente e qualidade das águas.

As agroindústrias são responsáveis pela geração de efluentes ricos em substâncias orgânicas, nutrientes (sobretudo nitrogênio e fósforo), sólidos, óleos e graxas (MESS et al., 2009).

O lançamento de efluentes com altos níveis de fósforo e nitrogênio em rios e lagos podem causar grandes alterações ambientais. O aumento das concentrações de nitrogênio e fósforo em corpos hídricos receptores é a principal causa da eutrofização, podendo gerar o crescimento descontrolado de uma ou mais espécies de algas (MAGUER et al., 2007). Os nutrientes, ao serem lançados na água, contribuem para o aumento da produção orgânica do sistema, com elevação da biomassa fitoplanctônica e conseqüente diminuição na incidência de luz. O ecossistema pode produzir mais matéria orgânica do que é capaz de consumir e decompor, com profundas mudanças no metabolismo de todo o ecossistema e nas concentrações de oxigênio nas camadas superiores, devido à decomposição bacteriana da matéria orgânica no sedimento (ESTEVES, 1998).

Lançar os resíduos gerados sem se preocupar com os efeitos decorrentes dessa ação, não é mais aceitável. Com a legislação cada vez mais rigorosa, em busca de um desenvolvimento sustentável, as empresas são levadas a tomar medidas para controlar a poluição ambiental (SIMIÃO, 2011).

### 2.1.1 Efluente de maltarias

O malte é o produto da germinação das sementes de qualquer cereal (cevada, milho, trigo, entre outros) sob condições controladas. A cevada, por exemplo, é umedecida e germinada a fim de produzir enzimas, que serão utilizadas na conversão das matérias-primas em mosto cervejeiro (VENTURINI FILHO, 2000). Em seguida é seca e tostada e, após um período de repouso, é utilizada no processo de fabricação da cerveja. O tempo e a temperatura de secagem são rigorosamente controlados para se obter o malte ideal para cada tipo de cerveja.

A maltaria faz uso de um grande volume de água, utilizada para a limpeza da matéria prima, maceração, limpeza de pisos e equipamentos. Estes processos geram um grande volume de efluente compostos de restos de grãos, sólidos sedimentáveis, proteínas e açúcares (SANTOS; RIBEIRO, 2005).

Na produção do mosto cervejeiro são utilizados cerca de 174 a 260 litros de água para cada litro de cerveja produzido e no processo de fermentação, utiliza-se de 40 a 80 litros de água para cada litro de cerveja (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

O efluente da maltaria é submetido ao tratamento biológico e físico-químico. A natureza do tratamento biológico de efluentes é acelerar os mecanismos presentes de degradação natural nos corpos receptores. Logo, a decomposição dos poluentes orgânicos é alcançada em condições controladas em intervalos menores do que nos sistemas naturais, por meio de reações bioquímicas utilizando-se de microrganismos como agentes de catálise (VON SPERLING, 1996).

A base do processo microbiológico é a utilização do material presente nos efluentes como forma nutricional para o microrganismo. A matéria orgânica é convertida em gás carbônico, água, material celular e produtos de fermentação anaeróbia. Como qualquer cultivo celular, a decomposição biológica será efetiva se houver condições favoráveis de pH, temperatura, concentração de macro e micronutrientes (VON SPERLING, 1996).

O tratamento físico-químico remove ortofosfatos, polifosfatos e fósforo orgânico que participam das reações de precipitação bem como de adsorção.

O objetivo da precipitação é converter a forma solúvel em espécies insolúveis contendo fósforo, facilitando a sua remoção. São adicionados coagulantes metálicos para precipitar e aumentar as remoções de fósforo no efluente (BRATBY, 2006).



### 2.1.2 Tratamento de efluentes

Os tratamentos de efluentes industriais envolvem processos necessários à remoção de impurezas geradas na fabricação de produtos de interesse. Os métodos de tratamento estão diretamente associados ao tipo de efluente gerado, ao controle operacional da indústria e às características da água utilizada (FREIRE et al., 2000).

O tratamento preliminar de águas residuárias tem por objetivo apenas a remoção dos sólidos grosseiros, enquanto o tratamento primário visa à remoção de sólidos sedimentáveis e parte do material orgânico. Em ambas as etapas, predominam os mecanismos físicos de remoção de poluentes. No tratamento secundário, predominam mecanismos biológicos, cujo objetivo é, principalmente, a remoção de material orgânico e, eventualmente, nutrientes (nitrogênio e fósforo). O objetivo do tratamento terciário é a remoção de poluentes específicos (usualmente tóxicos ou compostos não biodegradáveis) e, a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário (VON SPERLING, 1996).

Algumas alternativas para o tratamento de efluentes são, a oxidação (MASROOR et al., 2009), a coagulação e floculação (FUCHS et al., 2006), a filtração (CHANG; KIM, 2005), a ozonização (ALMEIDA et al., 2004), a cloração (DALY et al., 2007), a osmose reversa (CARON et al., 2010), dentre outros. O tratamento por estes meios mostra-se, na maioria das vezes, eficiente na remoção dos poluentes, no entanto, apresentam uma alta geração de resíduos.

Muitos dos processos físico-químicos utilizados em estações de tratamento de efluentes envolvem a adição de agentes coagulantes e floculantes, como por exemplo, os polímeros e sais de ferro e de alumínio. Os tratamentos com polímeros podem causar impactos ambientais devido à toxicidade de algumas moléculas usadas, podendo, mesmo em baixas concentrações, desequilibrar o meio ambiente em relação aos organismos aquáticos do corpo receptor (GODWIN-SAAD et al., 1994). Os agentes químicos podem causar danos à saúde, além de impacto ambiental, alterando o equilíbrio do corpo receptor, causando alterações na concentração de ânions e, conseqüentemente, uma mudança na condutividade do efluente, quando comparada com a qualidade da água de entrada na indústria (WU et al., 2011). Os coagulantes químicos são utilizados na forma de sulfatos, que elevam a concentração desse íon no efluente final, podendo alterar a qualidade da água do corpo receptor. Excesso de sulfato no leito poderá precipitar com o cálcio presente no sedimento e

na água ou participar de processos de oxi-redução na geração de sulfetos em condições anaeróbias (WATRAS; HUCKABEE, 1994).

Dentre os processos de remoção de nitrogênio estão a cloração, a troca iônica com resina específica para os íons amônio e nitrato, e tratamentos biológicos com implementação da nitrificação seguida de desnitrificação. Os efeitos sobre cada forma de nitrogênio e as eficiências de remoção de diversos processos são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 - Efeito de diversos tipos de tratamento nos compostos de nitrogênio.

Tratamento ou processo	Espécie de nitrogênio			Eficiência de remoção de nitrogênio total
	N-Orgânico	N-Amoniacal	Nitrato	
<b>Tratamento convencional</b>				
1. Primário	10-20%	Sem efeito	Sem efeito	5-10%
2. Secundário	15-50%	< 10%	Desconsiderável	10-30%
<b>Processos biológicos</b>				
1. Assimilação por bactérias	Sem efeito	40-70%	Desconsiderável	30-70%
2. Desnitrificação	Sem efeito	Sem efeito	80-90%	70-95%
3. Remoção de algas	Transformação parcial em N-amoniacal	Assimilação pelas algas	Assimilação pelas algas	50-80%
4. Nitrificação	10-50%	Transformação em nitrato	Sem efeito	5-20%
5. Lagoas de oxidação	Transformação parcial em N-amoniacal	Remoção parcial por volatilização	Remoção parcial nitrificação/desnitrificação	20-90%
<b>Processos químicos</b>				
1. Cloração Breakpoint	Desconhecido	90-100%	Sem efeito	80-95%
2. Coagulação química	50-90%	Desconsiderável	Desconsiderável	20-30%
3. Adsorção do carbono	30-50%	Desconsiderável	Desconsiderável	-
4. Resina de troca iônica (específica para $\text{NH}_4^+$ )	Desconsiderável/Desconhecido	80-97%	Sem efeito	70-95%
5. Resina de troca iônica (específica para $\text{NO}_3^-$ )	Desconsiderável	Desconsiderável	75-90%	70-90%

Fonte: Adaptado de METCALF; EDDY (1991).

A nitrificação é um processo biológico de oxidação da matéria nitrogenada, que ocorre em condições aeróbias, onde a amônia se converte primeiro em nitrito e depois em nitrato (JORDÃO; PESSÔA, 1995; CRITES; TCHOBANOGLIOUS, 2000). O processo de desnitrificação é a redução bioquímica não assimilatória do  $\text{NO}_3^-$  sob condições anóxicas, ou de baixa pressão de oxigênio. O processo requer fontes de carbono orgânico e tem como produtos a geração de oxigênio e alcalinidade no meio, esse processo é realizado por microrganismos desnitrificantes que em sua maioria são anaeróbios facultativos, estes tem a capacidade de utilizar  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NO}_2^-$  como aceptores de elétrons, resultando na liberação de  $\text{N}_2$  e dióxido nitroso para a atmosfera (AHN, 2006).

As microalgas são uma alternativa plausível para o tratamento na remoção de poluentes, pois possuem a capacidade de utilizar o nitrogênio inorgânico e o fósforo para seu crescimento. Além de auxiliarem na retirada de metais tóxicos e de produtos químicos e orgânicos contaminantes (NOÛE et al., 1992).

### **2.1.3 Legislação ambiental**

Para o Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) determina através da Resolução CONAMA nº 430 de 2011 as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

Para o Estado do Rio Grande do Sul, o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA) com as Resoluções CONSEMA nº 128 e nº 129 de 2006 determinam os padrões de lançamento de efluente e toxicidade permitida.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores máximos de emissão de lançamento de efluentes líquidos permitidos pela Resolução CONSEMA nº 128 de 2006.

Tabela 1 - Valores máximos de emissão de DBO<sub>5</sub>, DQO e Sólidos Suspensos (SS).

Faixa de vazão (m <sup>3</sup> /d)	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	SS (mg/L)
Q < 20	180	400	180
20 ≤ Q < 100	150	360	155
100 ≤ Q < 500	110	330	125
500 ≤ Q < 1000	80	300	100
1000 ≤ Q < 3000	70	260	80
3000 ≤ Q < 7000	60	200	70
7000 ≤ Q < 10000	50	180	60
10000 ≤ Q	40	150	50

DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; SS: Sólidos Suspensos.  
Fonte: Consema (2006).

Tabela 2 - Padrões de emissão para os parâmetros NTK e Fósforo.

Faixa de vazão (m <sup>3</sup> /d)	Nitrogênio Total Kjeldahl			Fósforo	
	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência NTK (%)	Nitrogênio Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Eficiência (%)
Q < 100	20	75	20	4	75
100 ≤ Q < 1000	20	75	20	3	75
1000 ≤ Q < 10000	15	75	20	2	75
10000 ≤ Q	10	75	20	1	75

Fonte: Consema (2006).

## 2.2 MICROALGAS

As microalgas estão entre as formas mais antigas de vida do planeta, surgindo como precursoras das plantas. Estes organismos podem apresentar estrutura procariótica ou eucariótica, sendo que a procariótica se assemelha às bactérias (cianobactérias). As algas eucarióticas compreendem diversos tipos de microalgas comuns, estas são classificadas em classes, a qual é definida principalmente pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular básica. Dentre as classes mais importantes destacam-se as microalgas verdes (*Chlorophyta*), microalgas vermelhas (*Rhodophyta*) e microalgas diatomáceas (*Baccilariophyta*) (BRENNAN; OWENDE, 2010).

São consideradas responsáveis pela produção de 50% do oxigênio e da fixação de 50% do carbono no planeta, trabalham convertendo luz solar e dióxido de carbono em biomoléculas. Embora a maioria das microalgas cresça exclusivamente realizando a fotossíntese, algumas espécies possuem a capacidade de crescer heterotróficamente, onde são disponibilizados às células todos os nutrientes necessários para que desempenhem seus processos metabólicos sem a presença de luz e ainda cultivos mixotróficos, no qual atuam o metabolismo heterotrófico e autotrófico, e a microalga simultaneamente assimila o CO<sub>2</sub> autotroficamente e o carbono orgânico a ela fornecido (RADMANN et al., 2009). As espécies mais estudadas para aplicações biotecnológicas são as microalgas verdes e as diatomáceas (HU et al., 2008).

A interação dos fatores químicos, físicos e biológicos influencia no cultivo de microalgas, podendo ser favoráveis ou desfavoráveis ao crescimento da microalga. Os fatores biológicos estão associados à taxa metabólica celular, enquanto que os fatores físicos e químicos, relacionam-se a efeitos provocados pela luz, temperatura e disponibilidade de nutrientes (RICHMOND, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2006; DERNER et al., 2006; RAVEN, 1990).

O cultivo das microalgas pode ser realizado em diversos sistemas, com volumes e características diferentes, dentre os sistemas abertos destaca-se o *raceway*, e em sistemas fechados os biorreatores tubulares.

Os fotobiorreatores tubulares são considerados plausíveis para a produção de culturas em grande escala (CHISTI, 2007). Em relação aos sistemas abertos, apresenta características vantajosas em termos de controle de pH e temperatura, melhor proteção contra contaminações, agitação mais eficiente, e a densidade celular atingida é maior (MATA et al., 2010; CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Uma das vantagens do cultivo em sistema aberto é a facilidade de construção e operação. Entretanto, fatores como a biologia microalgal, área de implantação do sistema, energia, água, nutrientes, clima e o produto de interesse final devem ser considerados (BOROWITZKA, 1999). Entre as limitações do cultivo de microalgas em sistema aberto destacam-se a utilização de pouca luz pelas células e perdas por evaporação. Além disso, suas taxas de transferência de massa são muito pobres, devido aos mecanismos de agitação serem menos eficientes, resultando em uma baixa produtividade de biomassa (UGWU et al., 2008).

As microalgas possuem a capacidade de se adaptarem à diversos ambientes, podendo ajustar ou alterar a sua estrutura interna para excretar uma gama de compostos que podem atuar como inibidores de outros organismos. Podem assumir vários tipos de metabolismos,

sendo capazes de uma mudança metabólica como resposta às mudanças das condições ambientais (MATA et al., 2010). A Tabela 3 apresenta a composição química das microalgas *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* e *Synechococcus*.

Tabela 3 - Composição química das microalgas.

Microalga	Composição química (% massa seca)				
	Proteína	Carboidratos	Lipídios	Clorofila	Ácidos nucleicos
<i>Chlorella</i>	51-58	12-26	14-22	2,0	4-5
<i>Scenedesmus</i>	50-56	10-17	12-14	-	3-6
<i>Spirulina</i>	46-63	8-14	4-9	0,74	2-5
<i>Synechococcus</i>	63	15	11	-	5

Fonte: BECKER (1994); MANRICH et al. (2014); VONSHAK (1997).

Em teoria, quaisquer instalações que utilizem biomassa e produzam mais de um produto podem ser consideradas biorrefinarias. O conceito distingue-se, portanto, de uma simples planta que produz um único produto com base em uma matéria-prima renovável (DOE, 2006).

O conceito é análogo ao das refinarias de petróleo, que fabricam múltiplos produtos como combustíveis e também, uma parcela de produtos químicos de alto valor unitário. Em síntese, biorrefinaria é um termo que se refere ao uso de matérias-primas renováveis e de seus resíduos, de maneira integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica, de uma variedade de substâncias e energia, com a mínima geração de resíduos e emissões de gases poluidores (NREL, 2006).

Num conceito de biorrefinaria, a possibilidade de valorização dos resíduos da biomassa microalgal, por extração de compostos de alto valor agregado (proteínas, lipídios e pigmentos), permite reduzir os custos da produção industrial de microalgas. Os efluentes resultantes da colheita podem ser reaproveitados para novas culturas de microalgas (CHISTI, 2008).

### 2.2.1 Aplicações biotecnológicas das microalgas

O uso de microalgas para a biorremediação de águas residuárias foi investigado pela primeira vez na década de 1950 por Golueke et al (1957). As microalgas utilizam os nutrientes presentes no efluente para seu crescimento. Um dos benefícios da utilização de

microalgas no tratamento de efluentes é que estas produzem  $O_2$  durante a fotossíntese, promovendo a degradação bacteriana aeróbia dos componentes orgânicos. A degradação bacteriana, por sua vez, produz  $CO_2$ , o que promove a fotossíntese e a absorção de nutrientes inorgânicos pelas microalgas (MONA, 2013). As microalgas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes para uma variedade de fins, como remoção de demanda química e bioquímica de oxigênio, remoção de nitrogênio e fósforo, e também para a remoção de metais tóxicos (ABDEL-RAOUF et al., 2012).

As microalgas também podem agir na remoção de substâncias tóxicas do solo. Elas auxiliam na biorremediação de íons de metais pesados, como ferro e cromo (RICHARDS et al., 2012). As microalgas têm a capacidade de metabolizar esses elementos nocivos em níveis substanciais (MADHU et al., 2014). Estas possuem mecanismos moleculares diferenciados que permitem a discriminação entre os metais tóxicos não essenciais daqueles essenciais para o seu crescimento (HUGO et al., 2006).

A importância da utilização de microalgas no tratamento de águas residuárias é que as mesmas em sua nutrição necessitam de compostos orgânicos, favorecendo o tratamento das águas com a redução dos compostos de nitrogênio e fósforo. Desse modo, com a remoção desses nutrientes nas águas residuárias, evita-se a eutrofização dos corpos aquáticos (MATA et al., 2010).

As microalgas têm sido investigadas para a produção de biocombustíveis, incluindo biodiesel pela extração e transformação do material lipídico, bioetanol produzido a partir de material celulósico, hemiceluloses, carboidratos e resíduos, bem como para a produção de biogás, bio-hidrogênio e outros (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Inicialmente, a análise das microalgas como potencial fonte de substituição dos combustíveis fósseis ocorreu na década de 1970, porém os custos de produção proibitivos e limitações desencorajaram o desenvolvimento comercial das microalgas. Estudos posteriores durante os anos de 1980 e seguintes, mostram uma evolução, permitindo estudar o potencial comercial das microalgas para a produção de biocombustíveis (LI et al., 2008).

O nitrogênio e o fósforo são utilizados pelas microalgas para produzir compostos bioquímicos, sendo que, alterações nas concentrações de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, irão influenciar na composição bioquímica da biomassa (KLAUSMEIER et al., 2004; LOLADZE; ELSER, 2011). O nitrogênio é predominantemente utilizado para a síntese de proteínas, enquanto o fósforo é incorporado principalmente no RNA ribossomal. Quando estes nutrientes, nitrogênio ou fósforo são reduzidos, a divisão celular diminui, mas a aquisição de carbono através da fotossíntese continua. Portanto, as células tendem a acumular

metabólitos ricos em carbono, tais como carboidratos ou lipídios sob baixas concentrações de nitrogênio e fósforo (GONZÁLES-FERNÁNDEZ; BALLESTEROS, 2013; SMITH et al., 2010).

Em condições ambientais desfavoráveis ou de estresse, muitas microalgas alteram suas vias biossintéticas para a formação e acúmulo de lipídios, principalmente na forma de triacilgliceróis que servem principalmente como armazenamento de carbono e energia. A composição de ácidos graxos de óleo de microalgas típico é composta principalmente de misturas de ácidos graxos palmítico, linoleico e linolênico (COLLA et al., 2004).

A utilização de microalgas na produção de biocombustíveis é uma alternativa economicamente eficaz e ambientalmente sustentável. Podendo produzir de 3 a 10 vezes mais energia por hectare em comparação com culturas terrestres, e ainda podem ser acopladas a sistemas de mitigação de CO<sub>2</sub> e ao tratamento de águas residuais (DEMIRBAS, 2010).

Os principais mecanismos de remoção de nutrientes pelas microalgas é a absorção de amônia para dentro da célula (HOFFMAN, 1998; BICH et al., 1999). As concentrações destes nutrientes no efluente variam de acordo com as características do efluente e da tecnologia aplicada ao tratamento biológico.

O uso de microalgas no tratamento de águas residuárias é uma alternativa técnico-econômica potencial em relação aos sistemas convencionais secundários e terciários de efluentes (MEZZOMO et al., 2010; ZEPKA et al., 2010).

## **2.3 BIOCOMBUSTÍVEIS**

A procura de recursos limpos que permitam assegurar as necessidades energéticas futuras constitui um dos maiores desafios da atualidade. O crescente preço dos combustíveis e o foco internacional sobre o impacto ambiental das emissões gasosas têm conduzido à procura de recursos renováveis e ao desenvolvimento de tecnologias verdes que suportem a indústria e as necessidades do mercado mundial (MATA et al., 2010).

O termo biocombustível refere-se à combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos provenientes de matérias-primas renováveis. De acordo com a Lei nº 9.478, de 6 de agosto de 1997, biocombustível é todo combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores e combustão interna, ou, conforme regulamento, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil (BRASIL, 2014).



Os biocombustíveis podem ser produzidos a partir de qualquer fonte de carbono, no entanto a mais comum tem sido a utilização de plantas fotossintéticas que capturam a energia solar. Esta biomassa tem sido reconhecida como a maior fonte de energia renovável para suprimir o declínio das fontes fósseis (DEMIRBAS, 2005).

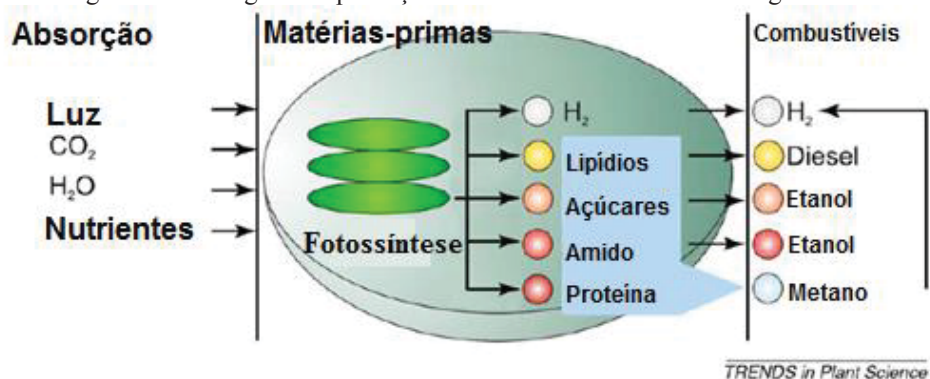
Os biocombustíveis têm sido classificados de acordo com a matéria-prima utilizada para a sua produção. No caso dos biocombustíveis de primeira geração, estes são produzidos principalmente a partir de culturas de alimentos, como grãos, cana-de-açúcar e óleos vegetais. O biocombustível de segunda geração é aquele produzido a partir de culturas energéticas celulósicas, tais como resíduos agrícolas e florestais, ou subprodutos, como palha de trigo e biomassa lenhosa (CHARLES et al., 2007). Desafios sociais, ambientais, econômicos e éticos estão surgindo, especialmente no que diz respeito aos chamados biocombustíveis de primeira geração produzidos a partir de culturas alimentares (MOHR; RAMAN, 2013).

O surgimento de vastas plantações para a produção de biocombustíveis em várias partes do mundo e o aumento dos preços dos alimentos, provocaram uma rápida mudança no pensamento sobre esta tecnologia. Gerou-se um pensamento de conflito entre alimento e combustível com o uso de terras aráveis.

O biocombustível de segunda geração apresenta vantagens sobre o de primeira geração, visto que este não utiliza culturas alimentares para ser produzido. No entanto, a estrutura cristalina da celulose, utilizada para a produção do biocombustível dificulta o processo de hidrólise (LYND et al., 2005; LYND et al., 2002). Além disso, também pode contribuir para a questão alimentos *versus* combustível, devido à sua dependência de terrenos adequados (SEARCHINGER et al., 2008).

Para tanto, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas pode substituir eficientemente os combustíveis de petróleo e estão associados com ampla disponibilidade, tecnologia, facilidade de transporte, armazenamento e versatilidade na utilização em motores, assim como benefícios sócio-econômicos e ambientais. As vantagens de utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis estão associadas à sua produção contínua, o ciclo de divisão celular simples, aquisição de compostos orgânicos através da fotossíntese, a tolerância a diferentes condições ambientais, a utilização de resíduos ou água não potável, o uso de terra não arável e, quando submetidos à estresse físico e químico, pode-se induzir a produção de altas concentrações de compostos específicos, como lipídios e carboidratos. Além disso, a aplicação de microalgas para biocombustíveis auxilia na redução de dióxido de carbono, sendo o principal gás na contribuição do efeito estufa, reduzindo assim, as alterações climáticas (COSTA; MORAIS, 2011).

Figura 1 - Visão geral de produção de biocombustíveis de microalgas.



Fonte: Adaptado de Stephens et al. (2010).

As microalgas são consideradas matérias-primas para o estabelecimento futuro de biorrefinarias, devido ao seu potencial para a obtenção de múltiplos produtos. Uma biorrefinaria pode gerar diferentes produtos de alto valor comercial a partir da biomassa microalgal (JASVINDER; GU, 2010). O conceito de biorrefinaria pode trazer ainda, resultados satisfatórios em relação à sustentabilidade e questões ambientais, com a diminuição da emissão de gases de efeito estufa, mudanças no uso de terras para a produção de combustíveis e futura insuficiência alimentar. Além da obtenção de biomassa para a produção de biocombustíveis, há a possibilidade de produção de alimentos e fertilizantes. O CO<sub>2</sub> liberado pela planta de geração de energia pode ser utilizado novamente para a produção de biomassa, reduzindo o CO<sub>2</sub> na atmosfera (SCHMID-STAIKER, 2009; HARUN et al., 2010). As biorrefinarias podem produzir energia na forma de calor ou através da produção de biocombustíveis, produtos com aplicações na área de cosméticos ou medicinais, matérias como plástico e fontes de alimentação humana e animal.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 LOCAL DE ESTUDO**

O local da coleta das amostras de efluente foi na Estação de Tratamento de Efluentes de uma maltaria, localizada na região Norte do Estado do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Operações Unitárias, Laboratório de Aulas Práticas e Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos e Laboratório de Química e Efluentes e Saneamento Ambiental do Curso de Engenharia Ambiental, da Universidade de Passo Fundo.

### **3.2 COLETA DAS AMOSTRAS**

Foram realizadas cinco coletas do efluente de maltaria: amostra 1 (janeiro 2015); amostra 2 (março 2015); amostra 3 (maio 2015); amostra 4 (agosto 2015) e amostra 5 (janeiro 2016).

As amostras foram coletadas na saída do tratamento de efluentes biológico, antes que o efluente fosse submetido ao tratamento físico-químico, em frasco de polietileno e armazenadas em refrigerador a 4 °C.

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE**

O efluente coletado na maltaria foi caracterizado em termos de Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), pH, nitrogênio em suas diferentes formas (nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal, nitratos, e nitrogênio total Kjeldahl), fósforo total, sólidos suspensos totais, turbidez, sulfatos e cloretos.

A Tabela 4 apresenta a metodologia adotada para a caracterização do efluente.

Tabela 4 - Metodologia analítica para caracterização do efluente.

<b>Análise</b>	<b>Método</b>	<b>Referência</b>
Nitrogênio Total Kjeldahl (NTK)	Volumetria (4500-N <sub>org</sub> B)	(APHA, 1995)
Nitrogênio Amoniacal	Volumetria (4500-NH <sub>3</sub> C)	(APHA, 1995)
Nitratos	Colorimetria (4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> B)	(APHA, 1995)
Nitrogênio Orgânico	Diferença N-Total e N-Amoniacal	(APHA, 1995)
pH	Potenciométrico (4500-H <sup>+</sup> B)	(AOAC, 1995)
DQO	Colorimetria (5220 D)	(APHA, 1995)
DBO	Volumetria (5210 B)	(APHA, 1995)
Sulfatos	Turbidimetria (4500-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> E)	(APHA, 1995)
Cloretos	Volumetria (4500-Cl <sup>-</sup> B)	(APHA, 1995)
Fósforo Total	Persulfato de Potássio (4500-P F)	(APHA, 1995)
Sólidos Suspensos Totais	Filtração (2540 D)	(APHA, 1995)
Turbidez	Nefelométrico (2130-B)	(APHA, 1995)
Milivoltagem	Potenciométrico (Seção 2510)	(AOAC, 1995)
Açúcares redutores (AR)	DNS	(MILLER, 1959)
Açúcares redutores totais (ART)	Adaptação do método DNS*	(MILLER, 1959; FURLAN et al., 2009)
Proteínas	Kjeldahl	(AOAC, 2005)

\*Para análise de açúcares redutores totais utilizou-se adaptação do método 3,5 DNS, com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos através da adição de ácido clorídrico 2 N.

### 3.4 ADAPTAÇÃO DOS CULTIVOS AO EFLUENTE

A adaptação dos cultivos de microalgas se deu em erlenmeyers de 1 L, com volume útil de 0,8 L, onde foram adicionados 5 mL do efluente de maltaria a cada dois dias, durante um período aproximado de 10 dias, ou até atingirem concentrações suficientes para passarem para a fase de seleção. Os meios de cultivo utilizados na adaptação foram específicos para cada microalga, com a redução de 50% nos compostos nitrogenados e fosfatados.

### 3.5 SELEÇÃO DE MICROALGAS

As microalgas utilizadas para a seleção foram: *Chlorella minutissima*, *Chlorella homosphaera*, *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina platensis* Paracas, *Scenedesmus obliquus* e *Synechococcus nidulans*. Estas microalgas foram obtidas da Coleção do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

As microalgas do gênero *Chlorella* foram cultivadas em meio Bristol's Modificado (MBM) (WATANABE, 1960), as do gênero *Spirulina* em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), e *Scenedesmus* e *Synechococcus* em meio BG-11 (RIPKA et al., 1979).

Os experimentos para a seleção de microalgas foram realizados através de cultivos descontínuos em duplicata, em erlenmeyer de 2 L, com volume útil de 1,8 L, utilizando meio de cultivo adequado para cada cepa de microalga, adicionado de 30% de efluente de maltaria. Para as microalgas utilizarem apenas as fontes de nitrogênio e fósforo presentes no efluente, o composto fosfatado não foi adicionado ao meio de cultivo, e a concentração do composto nitrogenado adicionada foi reduzida, a fim de manter uma proporção de 5:1 (N:P) entre os nutrientes (LI et al., 2011). Os cultivos foram conduzidos em estufa termostaticada não estéril, a 30 °C, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro, iluminação de  $33,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , aeração promovida por bombas de diafragma, com concentração inicial de inóculo de  $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e mantidos até a fase de declínio (Figura 2).

Figura 2 – Estufa termostaticada utilizada na seleção das microalgas.



A microalga selecionada foi aquela que apresentou os melhores resultados em relação ao crescimento celular e, remoção de nitrato e fosfato.

### 3.6 AUMENTO DE ESCALA DOS CULTIVOS

O experimento com a microalga selecionada foi realizado através de cultivo descontínuo, em tanque tipo *raceway* (Figura 3) de 300 L, com volume útil de 250 L, sendo que 50% do volume total era representado pela adição do efluente de maltaria. Com o aumento na proporção de efluente, utilizou-se meio Zarrouk em concentração de 20%, sem adição do composto fosfatado e diminuição do composto nitrogenado, para manter a relação de 5:1, entre nitrogênio e fósforo. O experimento foi realizado em modo descontínuo, em estufa de filme transparente, com agitação mecânica de  $0,35 \text{ m.s}^{-1}$ , com temperatura controlada entre  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , luminosidade em condições ambientais não controladas (superior a  $370 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), e concentração inicial de inóculo de  $0,30 \text{ g.L}^{-1}$ .

O cultivo foi realizado até a microalga atingir a fase estacionária, sendo que nessa fase foi retirada uma parte do cultivo para secagem e caracterização bioquímica da biomassa e o restante do cultivo permaneceu até atingir a fase de declínio, na qual novamente foi realizada secagem e caracterização bioquímica da biomassa.

Figura 3 – Tanque tipo *raceway* para aumento de escala no cultivo da microalga selecionada.



### 3.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS DURANTE O CULTIVO DE MICROALGAS

#### 3.7.1 Crescimento celular

A concentração celular foi determinada através da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro, a partir da curva de calibração que relaciona densidade ótica com massa seca de biomassa, a cada 48 h (COSTA et al., 2002).

A avaliação dos cultivos foi realizada através do cálculo da concentração final de biomassa ( $X_f$ , g.L<sup>-1</sup>); produtividade máxima de biomassa ( $P_{máx}$ , g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), segundo a Equação 1, e velocidade específica máxima de crescimento das microalgas ( $\mu_{máx}$ , d<sup>-1</sup>), por regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento (SCHMIDEL et al., 2001).

$$\text{Produtividade em biomassa}_{máx}(\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (1)$$

sendo:

$X_t$  = concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) no tempo t (d);

$X_0$  = concentração de biomassa (g.L<sup>-1</sup>) no tempo  $t_0$  (d).

#### 3.7.2 pH

O pH dos cultivos foi avaliado através do método potenciométrico segundo a AOAC (1995), a cada 48 h.

#### 3.7.3 Determinação de carboidratos

A concentração de carboidratos na biomassa algal ao final dos cultivos, foi determinada através do método proposto por Dubois et al. (1956) adaptados com prévia hidrólise ácida dos polissacarídeos pela adição de HCl 1,5 N (MARGARITES; COSTA, 2014).

A produtividade em carboidratos nos cultivos (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foi obtida de acordo com a Equação 2.

$$(\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = \frac{X_f \times \text{CHO}}{100 \times t_c} \quad (2)$$

sendo:

$X_f$  = concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ );

CHO = concentração de carboidratos (%);

$t_c$  = tempo de cultivo (d).

### 3.7.4 Determinação de proteínas

O teor de proteínas na biomassa algal foi determinado conforme metodologia proposta por Lowry et al. (1951).

### 3.7.5 Determinação de lipídios

O teor de lipídios da biomassa microalgal foi determinado na etapa de aumento de escala dos cultivos, através do método de Folch et al. (1957).

### 3.7.6 Nitrato e fosfato

As concentrações de nitrato e fosfato foram determinadas no início e no final dos cultivos das microalgas, conforme descrito em APHA (1995). Nos cultivos realizados durante a seleção, essas determinações ocorreram no primeiro e no último dia de cultivo, já no cultivo em grande escala, em tanque tipo *raceway*, as determinações destes compostos foram realizadas a cada três dias de cultivo. A Equação 3 foi utilizada para calcular a remoção de nitrato e fosfato. Para separação das células da microalga, a amostra foi centrifugada a 5500 rpm durante 12 min.

$$\text{Remoção (\%)} = \left( 1 - \left( \frac{C_f}{C_i} \right) \right) \times 100 \quad (3)$$

sendo:

$C_f$  = Concentração final;

$C_i$  = concentração inicial.

### 3.7.7 Umidade

O teor de umidade foi realizado em estufa a 105 °C por 4 h, de acordo com o método da AOAC (2005).



### **3.8 TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas através de análise de variância e teste de Tukey, com 5% de nível de significância, com o intuito de examinar as diferenças entre as médias de cada ensaio, que foram realizados em triplicata, para concentração celular final, velocidade específica máxima de crescimento, produtividade máxima em células, concentração de carboidratos da biomassa, produtividade em carboidratos e produtividade em lipídios, assim como remoção de nitrato e fosfato.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

A Tabela 5 apresenta os valores obtidos na caracterização das cinco amostras de efluente coletadas.

Tabela 5: Caracterização do efluente de maltaria tratado por processos biológicos (Reator anaeróbio + lodos ativados).

Análise	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
NTK (mg.L <sup>-1</sup> )	14,37±0,65	6,91±0,32	3,73±0,32	7,84±2,02	13,81±1,71
N-Amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	11,43±1,76	ND	ND	ND	10,85±0,5
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	-	13,61±0,54	11,78±1,12	12,96±1,37	24,88±2,12
N-Orgânico (mg.L <sup>-1</sup> )	2,94±1,94	6,91±0,32	3,73±0,32	7,84±2,02	2,03±1,29
pH	6,41±0,05	6,68±0,20	6,65±0,15	7,48±0,02	7,46±0,12
DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	310,25±60,55	105,39±17,01	87,64±49,62	328,15±37,76	504,66±9,27
DBO (mg.L <sup>-1</sup> )	105,0±14,14	-	-	57,5±24,75	-
Sulfatos (mg.L <sup>-1</sup> )	-	37,94±0,11	31,83±2,57	29,93±1,50	87,18±11,36
Cloretos (mg.L <sup>-1</sup> )	-	590,83±40,93	449,03±40,93	602,65±50,13	685,37±40,93
Fósforo (mg.L <sup>-1</sup> )	-	43,48±1,82	14,50±0,84	34,19±2,63	18,09±1,70
SST (mg.L <sup>-1</sup> )	-	301,0±60,81	-	279,0±26,87	761,0±66,47
Turbidez (NTU)	49,13±1,39	97,10±1,85	99,63±0,64	8,35±0,49	383,0±1,73
Milivoltagem (mV)	-	263,77±1,15	241,77±8,21	-8,97±0,60	-20,57±1,89
Carboidratos (AR/ART)(%)	-	-	-	ND	ND
Proteínas (%)	-	-	-	0,04±0,01	0,10±0,01

NTK: Nitrogênio Total Kjeldahl; DQO: Demanda Química de Oxigênio; DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; SST: Sólidos Suspensos Totais; ND: não detectado; (-): não caracterizado.

O tratamento biológico pelo qual o efluente é submetido é composto por reator UASB e lodo ativado, com um tanque anóxico entre eles, para desnitrificação. Os tratamentos biológicos de efluentes industriais têm como objetivo remover a matéria orgânica dissolvida e em suspensão, através da transformação desta, em sólidos sedimentáveis (flocos biológicos) ou gases, que são removidos do sistema (RAMALHO, 1991; VON SPERLING, 1996; METCALF; EDDY, 2003).

Os parâmetros utilizados na caracterização das amostras apresentam variações ao longo das coletas. Esta heterogeneidade pode ser atribuída às variações na estação de

tratamento (ETE). Durante o período da realização da coleta da amostra 1, a ETE passava por problemas evidenciados pela chegada de grão de cevada até a estação. Este fato pode justificar a diferença entre os resultados das análises de uma amostra para outra até a amostra 3. Ao longo dos 5 meses em que as três primeiras coletas foram realizadas, ocorreu uma diminuição nas concentrações de NTK e nitrogênio amoniacal, sendo acompanhada pela remoção de carbono representada pela Demanda Química de Oxigênio (DQO), que passou de 310 mg.L<sup>-1</sup> na amostra 1 para 87,64 mg.L<sup>-1</sup> na amostra 3. De acordo com Sant'anna Jr. (2010), a remoção de nitrogênio é favorecida quando a quantidade de carbono é reduzida no meio. Isto explica o aumento da eficiência dos processos de nitrificação e desnitrificação em função da diminuição dos valores de carbono (DQO). Os dados sugerem que o material suspenso passou a ser retido pelas peneiras na entrada da estação de tratamento, melhorando o desempenho da ETE e conseqüentemente a qualidade do efluente.

Já no período das coletas das amostras 4 e 5, ocorreu uma sobrecarga no sistema de tratamento de efluentes, fazendo com que as concentrações de todos os parâmetros aumentassem em relação às primeiras coletas.

O efluente apresenta valores para milivoltagem altos para as amostras 2 de 263,77 mV e 241,77 mV para a amostra 3, o que caracteriza um ambiente oxidante, condizente com o nível de oxidação do processo de lodo ativado presente na ETE. A DQO presente nestas duas amostras são baixas, portanto, o efluente apresentava uma carga orgânica menor, assim a quantidade de oxigênio para oxidação da matéria orgânica era suficiente, já nas amostras 4 e 5 onde a milivoltagem é negativa, ocorre que com a sobrecarga do sistema, este torna-se um meio redutor e não mais oxidante. Desta forma, o oxigênio presente não supre a demanda de carga orgânica presente no meio, não ocorrendo a devida oxidação da matéria e o efluente não é eficientemente tratado nesta etapa da estação de tratamento. Isto pode ser evidenciado pelo aumento de NTK, nitrato, sólidos suspensos e turbidez nestas amostras.

As concentrações de nitrato e fosfato presentes em efluentes tratados por processo biológico em maltarias, antes do tratamento físico-químico são elevadas para serem lançadas ao meio ambiente. O limite de emissão permitido pela Resolução CONSEMA nº 128 de 2006 para o parâmetro fósforo é de 1 mg.L<sup>-1</sup>. O efluente apresenta uma concentração de 34,19 mg.L<sup>-1</sup> para a amostra 4, utilizada na seleção das microalgas, e 18,09 mg.L<sup>-1</sup> na amostra 5, utilizada no cultivo em tanque tipo *raceway*. Já para nitrato, as concentrações são 12,96 mg.L<sup>-1</sup> e 24,88 mg.L<sup>-1</sup>, para as amostras 4 e 5, respectivamente. A Legislação não apresenta limites de lançamento para o composto nitrato, apenas para NTK e nitrogênio amoniacal.

Estas concentrações são inferiores às recomendadas em meios de cultivo de microalgas, que ficam entre 250 mg.L<sup>-1</sup> e 2500 mg.L<sup>-1</sup> para nitrato e entre 75 mg.L<sup>-1</sup> e 500 mg.L<sup>-1</sup> para fosfato (WATANABE, 1960; ZARROUK, 1966). Quando se realiza a restrição das concentrações de nitrogênio e fósforo nos cultivos algais, altera-se o metabolismo das algas induzindo-se o acúmulo de compostos como lipídios e carboidratos, ao invés de proteínas (CHEN et al. 2013; ZHU et al., 2014).

São muitas espécies de microalgas que acumulam maior teor de lipídios quando cultivadas em deficiência de nitrogênio (BECKER, 2004). Estudos com 30 espécies de microalgas mostraram que algas verdes, com 17% de lipídios, aumentaram 2 a 3 vezes o seu conteúdo lipídico, após 4 a 9 dias de ausência de nitrogênio (SHIFRIN; CHISHOLM, 1981). Quando nitrato, fosfato e bicarbonato estão em baixas concentrações, há um aumento significativo na fração de carboidratos das células, decrescendo a de proteína total, acompanhado de aumento da concentração de cloreto de sódio (TEDESCO; DUERR, 1989).

Sabe-se que a microalga acumula primeiramente, carboidratos, e começa acumular lipídios apenas quando o estresse nutricional é mais avançado (PROCHÁZKOVÁ et al., 2014; ZHU et al., 2014).

Estudos sugerem que a proporção de nitrogênio:fósforo (N:P) seja um fator crítico e que influencia, tanto no crescimento da microalga quanto na remoção de nutrientes (LI et al., 2010). Quando a proporção N:P é ajustada, os nutrientes presentes no efluente são eficientemente removidos. Para o ajuste pode ser utilizada a fórmula empírica de Stumm para microalgas (C<sub>100</sub>O<sub>48</sub>H<sub>183</sub>N<sub>11</sub>P<sub>1</sub>). No entanto, na prática, a relação entre a absorção de nutrientes (N:P) não segue necessariamente a composição da fórmula proposta. A composição das microalgas está significativamente relacionada com as espécies de microalgas e as condições de cultivo. As microalgas podem efetivamente remover nitrogênio e fósforo e ao mesmo tempo alcançar elevadas quantidades em biomassa, apenas quando a proporção de N:P for adequada.

Li et al. (2010) reportaram que a proporção N:P teve efeito significativo na remoção de nutrientes, determinando que a proporção adequada para a microalga *Scenedesmus* sp. foi de 5:1 – 8:1 (N:P), o que foi semelhante para a proporção de N:P no estudo de Zhang et al. (2014) utilizando a microalga *Scenedesmus obliquus* e para Aslan e Kapdan (2008), utilizando a microalga *Chlorella vulgaris*.

Nesta pesquisa, para a utilização do efluente de maltaria no cultivo de microalgas, fez-se necessário que uma quantidade de nitrato fosse adicionada ao meio de cultivo, ajustando-se assim a proporção entre N:P (LI et al., 2010; ZHANG, et al., 2014; ASLAN; KAPDAN,

2008), levando-se em consideração que a concentração de fósforo no efluente é maior que a concentração de nitrogênio. Para favorecer o acúmulo de carboidratos ou lípidios, essas concentrações devem permanecer abaixo do recomendado para cultivo de microalgas, causando um estresse nutricional na microalga (CHEN et al. 2013; ZHU et al., 2014).

Assim como a razão N:P, a razão entre carbono e nitrogênio (C:N) também pode ser calculada, utilizando-se os valores de DQO para a concentração de carbono e NTK para nitrogênio. O efluente apresenta uma razão de C:N de 21,6 (amostra 1), 15,25 (amostra 2), 23,5 (amostra 3), próximas à requerida para o desenvolvimento de microrganismos em geral (C:N = 20) (PEARSON, 1990). Porém para as amostras 3 e 4, esta razão é superior, de 41,85 para a amostra 4, utilizada na seleção das microalgas, e de 36,54 para a amostra 5, utilizada no cultivo em tanque tipo *raceway*. Isto sugere que as microalgas podem crescer mesmo em efluentes com elevada carga orgânica.

O efluente apresenta uma concentração de sulfatos entre 29,93 mg.L<sup>-1</sup> e 87,18 mg.L<sup>-1</sup>, superior às necessidades metabólicas exigidas pelas cianobactérias para este ânion, que é em torno de 29,37 mg.L<sup>-1</sup> (ALLEN; STANIER, 1968; RIPKA et al., 1979).

Em relação aos íons cloretos, os valores para as amostras caracterizadas são superiores as presentes em meios de cultura específicos para cianobactérias (ALLEN; STANIER, 1968; RIPKA et al., 1979). Fatores como o aumento da salinidade do meio também foram documentados como tendo efeito estimulador na acumulação de carboidratos por microalgas (WARR et al., 1985).

A amostra 5 utilizada no aumento de escala do cultivo apresenta uma concentração de 10,85 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal. Estudos sugerem que microalgas têm tolerância entre 0,45 mg.L<sup>-1</sup> e 18 mg.L<sup>-1</sup> para este composto (COLLOS; BERGES, 2004).

O pH do efluente é em torno de 6,0 e 7,0 sendo que normalmente, o pH do meio de cultivo de microalgas varia de 7 a 9 (RAVEN, 1990).

Em relação às concentrações de carboidratos e proteínas, essas concentrações são irrelevantes, visto que as amostras utilizadas na seleção e no aumento de escala estão isentas de carboidratos e a presença de proteína é baixa. Sendo assim, o acúmulo de carboidratos nas microalgas se dá apenas pela restrição nutricional dos compostos nitrogenados e fosfatos. A ausência de proteínas e carboidratos pode ser justificada pela presença de lodo nas amostras que utiliza estes compostos para sua nutrição.

Efluentes ricos em nutrientes, como o efluente da maltaria podem levar à poluição, ou seja, a eutrofização dos recursos hídricos. No entanto, estes podem ser alimentados em um sistema de produção de microalgas, rendendo benefícios significativos de controle de

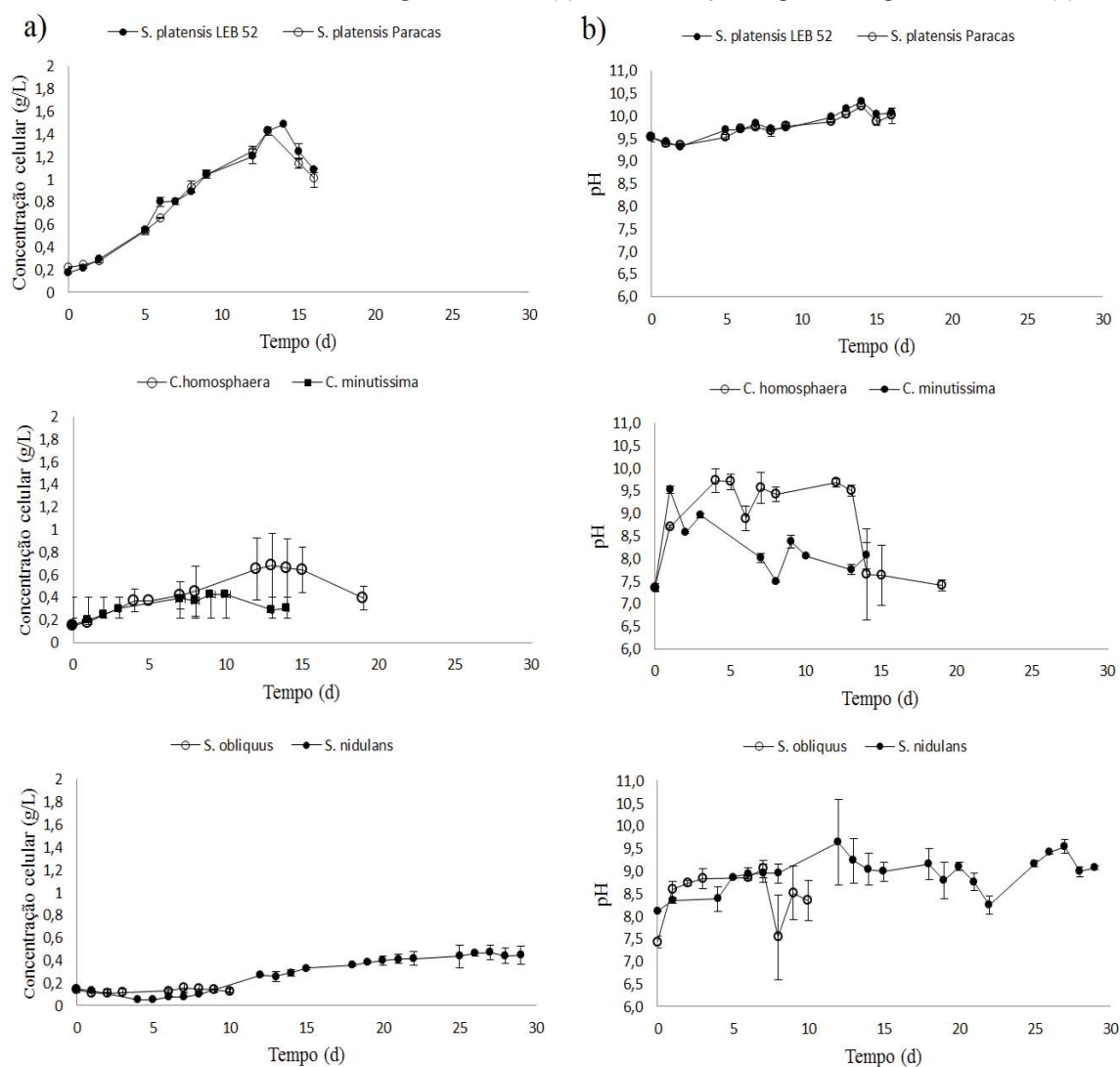
poluição, sem o uso da terra, sem competir para a produção de alimentos e a utilização sustentável dos recursos para a produção de biocombustíveis (BOBBAN; GRINSON, 2011).

## 4.2 SELEÇÃO DE MICROALGAS

### 4.2.1 Crescimento celular e composição bioquímica da biomassa

As características de crescimento das microalgas utilizadas na seleção são mostradas nas curvas de crescimento da Figura 4a. Estas curvas ilustram as fases de crescimento de cada microalga até atingirem a fase de declínio.

Figura 4 - Curvas de crescimento das microalgas estudadas (a) e determinação de pH ao longo dos cultivos (b).



Como outros microrganismos, o crescimento de microalgas pode ser dividido em quatro fases de crescimento: adaptação (lag), exponencial (log), estacionária, e declínio (LI

et al., 2011). As microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Spirulina platensis* Paracas, apresentam todas as fases de crescimento bem definidas, com uma fase de adaptação (lag) de 3 a 4 dias. A microalga *Scenedesmus obliquus*, apresentou um decréscimo na concentração celular com a adição do efluente ao meio de cultivo padrão, evidenciada por uma curva atípica. A microalga *Chlorella minutissima* apresentou o menor tempo de geração (tg) e a maior velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), não diferindo estatisticamente da *S. platensis* LEB 52 e *S. platensis* Paracas, isso é explicado através da curva de crescimento, na qual podemos observar que a microalga *C. minutissima* não apresenta um período de adaptação ao meio, com uma fase exponencial de crescimento a partir do primeiro dia de cultivo. Microalgas do gênero *Chlorella* são amplamente utilizadas em estudos fotossintéticos para a purificação de efluentes, sua escolha é justificada pela alta capacidade de multiplicar-se (ROGERS, 2005). Já a microalga *Synechococcus nidulas*, apresentou um período longo de adaptação ao meio e um crescimento celular significativamente menor quando comparada com as microalgas do gênero *Spirulina*.

As maiores produtividades em biomassa (Tabela 6) foram apresentadas pelas microalgas do gênero *Spirulina*, com  $0,144 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *S. platensis* LEB 52 e  $0,134 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para *S. platensis* Paracas, diferindo estatisticamente das demais microalgas estudadas. As produtividades obtidas neste estudo são menores do que as apresentadas pelo estudo de Jiang et al. (2015), ao cultivarem *Spirulina* em meio Zarrouk 100%. A adição de águas residuárias em meio de cultivo de microalgas, resulta numa diminuição da penetração de luz, e, portanto, numa diminuição da taxa fotossintética (DEPRAETERE et al., 2013). Em relação à concentração final de biomassa ( $X_f$ ), os valores são semelhantes aos de Chang et al. (2013) que utilizaram efluente sintético no cultivo de *Spirulina*, atingindo uma concentração final de biomassa de até  $1,75 \text{ g.L}^{-1}$ . As cianobactérias podem manter sua concentração celular quando cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio, isso ocorre pela degradação de suas ficobiliproteínas, fornecendo nitrogênio para a biossíntese (MILLER et al., 2002). As maiores concentrações de biomassa foram apresentadas pelas cianobactérias estudadas, *S. platensis* LEB 52, *S. platensis* Paracas e *Synechococcus nidulans*.

As menores produtividades em células foram obtidas nos cultivos das microalgas *Scenedesmus obliquus* ( $0,006 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), *Synechococcus nidulans* ( $0,013 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), *Chlorella homosphaera* ( $0,056 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) e *Chlorella minutissima* ( $0,058 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ). Os valores obtidos para as microalgas do gênero *Chlorella* foram menores que o reportado por Zhu et al. (2014), que utilizaram efluente de suinocultura para cultivar microalgas deste gênero, atingindo uma produtividade em biomassa de  $0,30 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ . Os autores cultivaram a microalga em meio

padrão BG-11, que apresenta maiores concentrações dos compostos quando comparadas com o meio MBM, utilizado neste estudo para microalgas deste gênero, outro fator que pode ter influenciado numa maior concentração celular é um cultivo com iluminação contínua e não com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

As microalgas que apresentaram maiores crescimentos foram as do gênero *Spirulina*, sendo que o meio utilizado para o cultivo destas (meio Zarrouk) apresenta uma concentração de carbono elevada quando comparada com os meios de cultivo utilizados para os experimentos com *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Synechococcus*. Nos cultivos, o carbono é considerado o macronutriente mais importante, uma vez que este constitui cerca de 50% da biomassa microalgal (ABALDE et al., 1995; GROBBELAAR, 2004). O efluente de maltaria utilizado no experimento, apresentava uma Demanda Química de Oxigênio de 328,15 mg.L<sup>-1</sup>, o que caracteriza uma fonte adicional de carbono ao cultivo. O emprego de fontes suplementares de carbono pode potencializar a taxa de crescimento, bem como, gerar uma maior quantidade de biomassa (APT; BEHRENS, 1999; CERÓN GARCÍA et al., 2005).

Todas as microalgas apresentaram variações acentuadas no pH ao longo do cultivo, exceto as microalgas *S. platensis* LEB 52 e *S. platensis* Paracas, sendo que o pH do meio permaneceu em torno de 9,0 a 10,0 (Figura 4b).

O pH é um dos fatores de maior importância no cultivo de algas, este determina a solubilidade do dióxido de carbono e minerais no meio, o que irá influenciar no metabolismo das microalgas. O pH depende de vários fatores, como a composição e capacidade tamponante do meio de cultivo, quantidade de dióxido de carbono dissolvido, temperatura e atividade metabólica das células (BECKER et al., 1988). Normalmente, o pH do meio de cultivo varia de 7 a 9 para a maioria das espécies de microalgas (RAVEN, 1990).

No início dos cultivos, todas as microalgas apresentaram um aumento no pH do meio. Esse aumento pode ocorrer devido à fixação do dióxido de carbono presente em efluentes, por meio da respiração das microalgas que proporcionam uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio, ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH<sup>-</sup>), acarretando um aumento do pH (MOTA; VON SPERLING, 2009; LI et al., 2011).

Em relação à composição da biomassa de cada microalga estudada (Tabela 6), a utilização do efluente de maltaria pré-tratado, e a diminuição nas concentrações de nitrato e fosfato, quando comparadas com cultivos utilizando meios padrões, específicos para cada uma das microalgas, a concentração de carboidratos aumentou em todos os ensaios. As maiores concentrações foram obtidas pelos cultivos das microalgas *Chlorella homosphaera*



(48,93%) e *Synechococcus nidulans* (49,86%). Sem alteração nos meios de cultivo, essas microalgas normalmente apresentam uma concentração de carboidratos de 12% a 26% para *Chlorella* e 15% para *Synechococcus* (BECKER, 1994). As células de cianobactérias, como as do gênero *Synechococcus*, possuem inclusões citoplasmáticas, como grânulos de glicogênio, presentes principalmente no citoplasma, nas membranas tilicoidais, e servem como fonte de carbono e energia (MORENO; RAMÍREZ, 2006; BÖGER et al., 1987). No caso de microalgas da divisão *Chlorophyta*, como as do gênero *Chlorella*, estas acumulam amido como fonte de reserva (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou concentração de carboidratos de 30,07%, sendo que a mesma apresenta cerca de 8%-14% de carboidratos em cultivo padrão (BECKER, 1994). Pelo aumento nas concentrações de carboidratos, tem-se uma diminuição na concentração de proteínas, de cerca de 46% a 63% em cultivo padrão, para 28,84% com a utilização do efluente.

Apesar das altas concentrações de carboidratos apresentadas pelas microalgas *C. minutissima* e *S. nidulans*, as produtividades em carboidratos obtidas por estas são estatisticamente menores quando comparadas com as produtividades obtidas por *S. platensis* LEB 52 (27,05 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e *S. platensis* Paracas (20,77 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), a diferença é justificada pelas maiores concentrações de biomassa que estas apresentam, 1,08 g.L<sup>-1</sup> para *S. platensis* LEB 52 e 1,01 g.L<sup>-1</sup> para *S. platensis* Paracas, diferindo estatisticamente tanto em concentração final de biomassa quanto em produtividade em carboidratos das outras microalgas estudadas.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos e caracterização da biomassa das microalgas estudadas durante a seleção.

Microalga	$X_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	$\mu_{\text{máx}}$ (d <sup>-1</sup> )	$P_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	tg (d)	Intervalo da		Produtividade	
					fase exponencial (d)	Proteína (%)	Carboidratos (%)	em Carboidratos (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
<i>S. platensis</i> LEB 52	1,08±0,02 <sup>b</sup>	0,14±0,007 <sup>bc</sup>	0,144±0,030 <sup>b</sup>	5,10±0,25 <sup>ab</sup>	5 - 9	28,84±1,45 <sup>a</sup>	30,07±1,14 <sup>b</sup>	27,05±0,51 <sup>b</sup>
<i>S. platensis</i> Paracas	1,01±0,22 <sup>b</sup>	0,16±0,002 <sup>bc</sup>	0,134±0,0006 <sup>b</sup>	4,20±0,06 <sup>a</sup>	3 - 9	20,67±3,75 <sup>a</sup>	24,69±0,21 <sup>a</sup>	20,77±4,77 <sup>b</sup>
<i>S. obliquus</i>	0,13±0,01 <sup>a</sup>	0,06±0,003 <sup>a</sup>	0,006±0,0007 <sup>a</sup>	11,00±0,58 <sup>bc</sup>	3 - 7	46,67±0,92 <sup>b</sup>	25,50±1,26 <sup>ab</sup>	3,22±0,43 <sup>a</sup>
<i>C. homosphaera</i>	0,39±0,10 <sup>a</sup>	0,09±0,022 <sup>ab</sup>	0,056±0,027 <sup>a</sup>	7,80±1,89 <sup>abc</sup>	7 - 12	25,61±1,79 <sup>a</sup>	48,93±0,04 <sup>c</sup>	10,16±2,67 <sup>a</sup>
<i>C. minutissima</i>	0,31±0,09 <sup>a</sup>	0,21±0,030 <sup>c</sup>	0,058±0,007 <sup>a</sup>	3,40±0,56 <sup>a</sup>	1 - 7	51,84±2,68 <sup>b</sup>	26,38±2,66 <sup>ab</sup>	5,69±1,07 <sup>a</sup>
<i>S. nidulans</i>	0,44±0,08 <sup>a</sup>	0,06±0,016 <sup>a</sup>	0,013±0,001 <sup>a</sup>	11,8±3,20 <sup>c</sup>	12 - 15	27,98±1,50 <sup>a</sup>	49,86±0,59 <sup>c</sup>	7,66±1,50 <sup>a</sup>

$X_f$ : concentração final de biomassa;  $P_{\text{máx}}$ : produtividade máxima de biomassa;  $\mu_{\text{máx}}$ : velocidade específica de crescimento das microalgas; tg: tempo de geração. Nos resultados valores seguidos de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Remoção de nitrato e fosfato

A Tabela 7 apresenta as concentrações de nitrato e fosfato presentes no primeiro e no último dia de cultivo das microalgas, durante a etapa de seleção.

Tabela 7 - Concentrações de nitrato e fosfato no primeiro e último dia de cultivo para cada microalga estudada na seleção.

Microalga	Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )			Fosfato (mg.L <sup>-1</sup> )		
	Inicial	Final	Remoção (%)	Inicial	Final	Remoção (%)
<i>S. platensis</i> LEB 52	32,76±5,06	2,16±0,08	93,13±2,18	39,81±1,08	4,07±0,63	89,76±1,03
<i>S. platensis</i> Paracas	32,36±0,61	9,42±1,62	70,72±0,88	44,66±2,49	9,87±1,79	77,67±5,26
<i>S. obliquus</i>	85,52±3,21	47,69±4,90	43,11±7,67	51,22±0,42	25,90±2,81	49,11±5,26
<i>C. homosphaera</i>	47,88±0,29	29,28±0,55	38,01±2,76	37,30±0,07	26,91±1,17	27,79±3,15
<i>C. minutissima</i>	50,36±3,97	17,01±1,65	66,25±0,52	40,28±1,50	23,18±1,54	42,51±1,70
<i>S. nidulans</i>	102,79±3,05	20,04±3,19	80,33±3,75	48,08±0,34	8,16±1,65	83,04±3,58

O processo de remoção de compostos nitrogenados e fosfatados pelas microalgas não apresenta exigência de carbono, sendo um processo atraente para o tratamento de efluentes secundários. As concentrações destes nutrientes nos efluentes secundários variam dependendo das características do efluente e da tecnologia aplicada no tratamento biológico (ASLAN; KAPDAN, 2006). No entanto, em meios com suplementação de carbono, como a utilização do efluente de maltaria que apresenta elevadas concentrações deste composto, as microalgas estudadas removeram eficientemente os compostos nitrogenados e fosfatados presentes no meio. As cianobactérias estudadas (*Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina platensis* Paracas e *Synechococcus nidulans*) apresentaram as maiores remoções, mostrando que as microalgas que apresentaram os maiores crescimentos, consumiram mais nutrientes e conseqüentemente removeram com maior eficiência os poluentes.

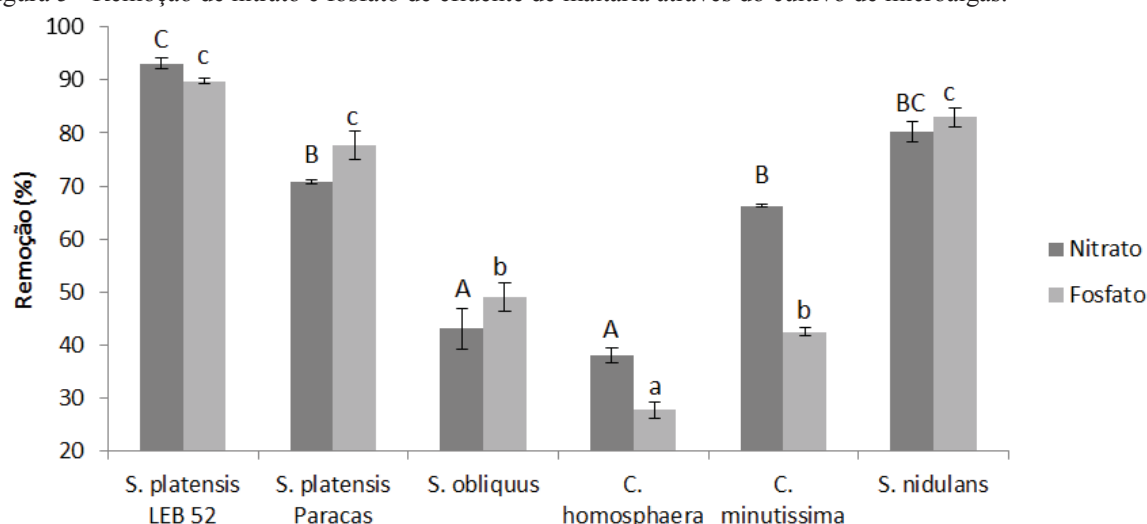
O aumento do pH no meio contribui para a precipitação de fósforo e o aumento da adsorção de fosfato pelas células da microalga (RUIZ-MARTIN et al., 2010) contribuindo para a diminuição deste composto. Como o pH dos cultivos das microalgas *Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina platensis* Paracas e *Synechococcus nidulans* permaneceram a maior parte do cultivo na faixa de 9 a 10, contribuiu para a remoção do fosfato presente no efluente. Já os cultivos de *Chlorella homosphaera*, *Chlorella minutissima* e *Scenedesmus*

*obliquus* que apresentaram as menores remoções de fosfato, mantiveram o pH abaixo de 9,0 durante a maior parte do cultivo, o que pode ter influenciado na assimilação do nutriente.

A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou uma remoção de 93,13% para nitrato e 89,76% para fosfato, não diferindo estatisticamente dos valores obtidos para a microalga *Synechococcus nidulans*, que teve a capacidade de remoção de 80,33% e 83,04% para nitrato e fosfato, respectivamente. A *Spirulina platensis* Paracas atingiu níveis de remoção de 77,67% para fosfato, sem diferença significativa em comparação com *S. platensis* LEB 52 e *S. nidulans*, e para nitrato uma remoção de 70,72%. As microalgas *Chlorella homosphaera*, *Chlorella minutissima* e *Scenedemus obliquus*, apresentaram as menores taxas de remoção, que ficaram em 38,01% de nitrato para *C. homosphaera* e 27,79% para fosfato. A microalga *C. minutissima* removeu 66,25% de nitrato e 42,51% de fosfato. E para a microalga *S. obliquus* a remoção ficou em 43,11% e 49,11% de nitrato e fosfato, respectivamente.

As microalgas que removeram com maior eficiência os poluentes pertencem a classe das *Cyanobacterias*, já as microalgas que apresentaram menor eficiência pertencem à classe das *Chlorophytas* (Figura 5). O metabolismo de cada classe pode apresentar diferenças, e por tanto contribuir ou não para a assimilação dos nutrientes presentes no meio (LOURENÇO, 2006).

Figura 5 - Remoção de nitrato e fosfato de efluente de maltaria através do cultivo de microalgas.



Letras iguais nas colunas (maiúsculas para nitrato e minúsculas para fosfato) não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A intensidade de luz pode afetar a absorção de nutrientes pelas microalgas, uma vez que esta fornece energia para as células. Foi utilizado no estudo um fotoperíodo de 12 h

claro/escuro. Estudos sugerem que algumas microalgas podem apresentar maiores eficiências de remoção de nitrato sob iluminação contínua (LEE; LEE, 2001).

De acordo com a Resolução CONSEMA nº 128 de 2006, o limite máximo de emissão para fósforo é de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , no entanto quando não atingido esse valor, pode-se adotar uma eficiência de 75% na remoção de fósforo total, os cultivos que não atingiram eficiência de 75% foram das microalgas *S. obliquus* (49,11%), *C. homosphaera* (27,79%) e *C. minutissima* (42,51%). E para nitrato, considerado uma substância potencialmente prejudicial, a legislação não estabelece limites de emissão, apenas para NTK e nitrogênio amoniacal.

Os valores de remoção obtidos através do cultivo utilizando a microalga *S. obliquus*, foram semelhantes aos reportados por González et al. (1997), cultivando microalga do gênero *Scenedesmus* em efluentes de indústria de laticínios e da suinocultura, com níveis de remoção de fosfatos em 55%. Em efluente municipal, esta microalga teve a capacidade de remover até 95,6% de fósforo total e 97,8% de nitrogênio total (SHEN et al., 2015).

Méndez (2003), utilizando microalga do gênero *Chlorella* atingiu níveis de remoção de nitrato próximos aos obtidos neste trabalho pela *C. minutissima*, com 65,67% de remoção, mas superiores em remoção de fosfato, com 75,33%. Aslan e Kapdan (2006), utilizando a microalga *Chlorella vulgaris* na remoção de nitrogênio e fósforo, obtiveram uma eficiência de remoção de 72% para nitrogênio e 28% para fosfato, inferior ao obtido pela microalga *C. minutissima*, e semelhante à remoção deste composto pela *C. homosphaera*.

A microalga *S. platensis* LEB 52, apresentou as maiores remoções de nitrato e fosfato. *Spirulina platensis* crescendo em efluente da produção de amido, apresentou capacidade de redução dos níveis de fosfato do efluente em 99% (PHANG et al., 2000). Esta também pode eficientemente remover nitratos, amônia e fosfatos de água residuária sintética (OGBONNA et al., 2000).

As microalgas são capazes de ajustar a concentração de nitrogênio e fósforo na sua biomassa em função do fornecimento destes nutrientes, os quais são importantes para conseguir a remoção simultânea de ambos, nitrogênio e fósforo em efluentes. As microalgas acumulam mais fósforo quando as concentrações de nitrogênio são elevadas. Isto implica que a concentração de nitrogênio suficientemente elevada em efluentes é um pré-requisito para a remoção eficaz de fósforo (BEUCKELS et al., 2015).

No tratamento de efluentes convencional, nitrogênio e fósforo são removidos a partir de dois processos separados. Geralmente, nitrogênio é convertido a  $\text{N}_2$  gasoso através do processo de desnitrificação, enquanto fósforo é precipitado com sais de metal. Microalgas, pelo contrário, eliminam nitrogênio e fósforo num único processo. Estas requererem os dois

nutrientes para produzir biomassa. Sendo que a remoção de um nutriente depende da disponibilidade do outro, microalgas não eliminam nitrogênio sem a presença de fósforo no efluente, e vice-versa, pois ambos os nutrientes são essenciais para o seu crescimento (ABDELAZIZ et al., 2013; CAI et al., 2013; CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Comparando-se com o processo de desnitrificação que apresenta remoção de 80% a 90%, as microalgas *S. platensis* LEB 52 e *S. nidulans* apresentaram remoções semelhantes, de 93,13% e 80,33%, respectivamente. Já os processos químicos de remoção como resina de troca iônica, apresenta remoção de 75% a 90% de nitrato, e os processos físicos como a eletrodialise com 30% a 50% de remoção e a osmose inversa com 60% a 90% de remoção de nitrato. Deste modo, o processo de remoção de nitrato pelas microalgas pode ser promissor, visto que atinge valores altos de remoção quando comparados com alguns dos processos utilizados nas estações de tratamento de efluentes (METCALF; EDDY, 1991).

Uma das vantagens de se utilizar o processo de remoção de compostos nitrogenados pelas microalgas é que estas podem assimilar o nitrogênio presente nas suas diferentes formas. No crescimento microalgal, quando utilizado o nitrato como fonte de nitrogênio, o nitrato é absorvido para dentro da célula da microalga, é reduzido à nitrito pela enzima nitrato-redutase, em seguida, reduz continuamente o nitrito à amônia e, finalmente, converte a amônia aos aminoácidos pela glutamina sintetase e glutamato sintetase (BECKER, 1994; PEREZ-GARCIA et al., 2011). Em contraste, no caso da utilização da amônia como fonte de nitrogênio, a microalga absorve diretamente para dentro da célula, que se acumula sob a forma de aminoácidos e utilizam estes para seu metabolismo (YANG et al., 2000). Características da taxa de crescimento e de absorção diferem entre fontes de nitrogênio devido à diferentes mecanismos de absorção do nutriente pelas microalgas.

Em relação aos processos convencionais utilizados para remoção de fósforo em estações de tratamento, destacam-se os processos físico-químicos, como a precipitação com sais metálicos ou com cal hidratada e processos de adsorção. Segundo Nunes (2004), a eficiência de remoção de fósforo por precipitação química gira em torno de 95%. Com o cultivo de microalgas atingiu-se valores de 89,76% de remoção para a microalga *S. platensis* LEB 52. Apesar das altas remoções dos processos físico-químicos, os autores Morita e Piveli (1998) enumeram as desvantagens relacionadas com o custo operacional relativamente elevado, devido aos gastos com produtos químicos e o grande volume de lodo gerado.

As espécies de *Spirulina* encontram aplicações amplas na preservação e recuperação do meio ambiente. A biomassa desta cianobactéria pode ser utilizada como um todo, nas formas fresca ou seca, com ou sem tratamento prévio, na recuperação de efluentes industriais,

pois apresenta grande capacidade de remoção de nutrientes, como íons nitrato e fosfato (OGBONNA et al., 2000), e metais tóxicos, como por exemplo o cobre, cromo, cobalto, cádmio, chumbo, zinco e níquel (GOKHALE et al., 2009; SEKER et al., 2008; VANNELA; VERMA, 2006; DAL MAGRO et al., 2013).

A biomassa da microalga utilizada no tratamento de efluentes, pode ser utilizada para produção de biocombustíveis, com um processo simples de filtração ou centrifugação. Essa biomassa é recuperada e pode ser avaliada em termos de carboidratos e lipídios para a produção do bioetanol ou biodiesel.

Levando-se em consideração que a microalga *S. platensis* LEB 52 apresentou as maiores remoções dos compostos nitrogenados e fosfatos, assim como a maior concentração celular e produtividade em carboidratos, esta foi selecionada para o aumento de escala do cultivo, em tanque tipo *raceway*.

### 4.3 AUMENTO DE ESCALA DA MICROALGA SELECIONADA

A Tabela 8 apresenta as concentrações de nitrato e fosfato ao longo do cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 em tanque *raceway*.

Tabela 8 – Concentrações de nitrato e fosfato no cultivo da microalga em tanque *raceway*.

Tempo de cultivo (d)	Concentração de nitrato	Concentração de fosfato
	(mg.L <sup>-1</sup> )	(mg.L <sup>-1</sup> )
0	37,57±2,16	7,10±1,06
3	32,36±3,00	9,68±1,21
6	21,27±7,23	12,22±0,91
9	20,62±3,05	2,74±0,17
12	20,45±0,05	2,72±0,31
15	19,52±0,37	1,66±0,85

A Figura 6 apresenta a curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* LEB 52 em tanque tipo *raceway*, assim como as curvas de remoção de nitrato e fosfato durante o cultivo, seguida da Tabela 9 que apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento da microalga.

Figura 6 - Curva de crescimento da microalga *S. platensis* LEB 52 (■), remoção de nitrato (▲), remoção de fosfato (●).

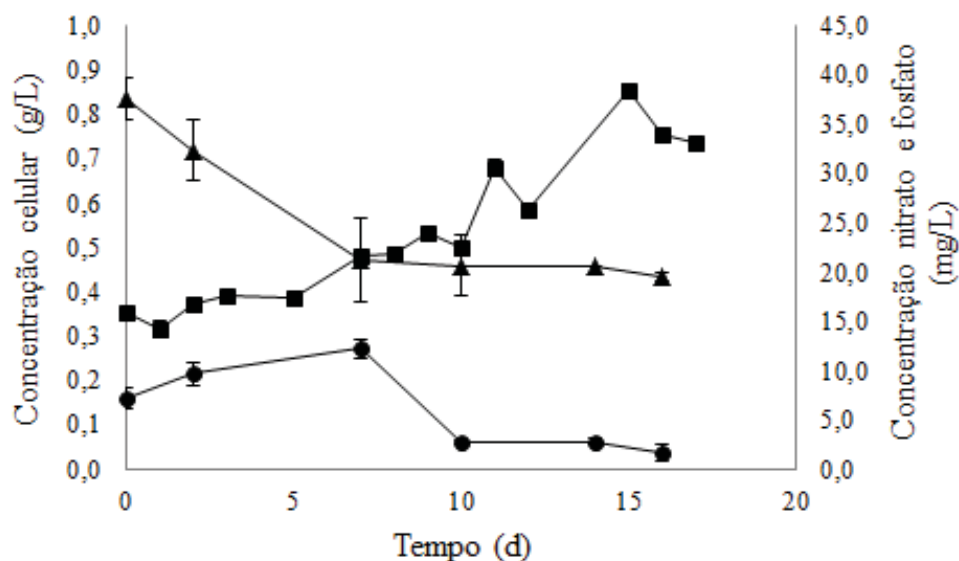


Tabela 9 – Parâmetros cinéticos de cultivo.

**Cultivo em tanque tipo *raceway pond***

***Spirulina platensis* LEB 52**

$X_f$ (g.L <sup>-1</sup> )	0,74±0,003
$\mu_{m\acute{a}x}$ (d <sup>-1</sup> )	0,04±0,004
$P_{m\acute{a}x}$ (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,030±0,002
tg (d)	15,3±1,25
<b>Intervalo da fase exponencial (d)</b>	<b>5 - 12</b>

$X_f$ : concentração final de biomassa;  $P_{m\acute{a}x}$ : produtividade máxima de biomassa;  $\mu_{m\acute{a}x}$ : velocidade específica de crescimento das microalgas; tg: tempo de geração.

Através da curva de crescimento da microalga (Figura 6) podemos observar que a *Spirulina platensis* LEB 52 cultivada em tanque tipo *raceway* apresentou uma fase estacionária curta, de apenas 2 dias, com diminuição na concentração celular logo após atingir esta fase. A duração de cada fase depende basicamente de fatores como a espécie cultivada e as condições de cultivo oferecidas (COUTTEAU, 1996). A menor permanência na fase estacionária pode ter influenciado os teores de carboidratos e lipídios que não diferiram estatisticamente entre as duas fases de crescimento analisadas (Tabela 10). Observa-se nos valores de proteína e carboidratos que ao passar para a fase de declínio ocorre uma diminuição nos teores de proteína e conseqüentemente um aumento na concentração de carboidratos.



Tabela 10 - Composição bioquímica da biomassa microalgal, produtividades em carboidratos e lipídio do cultivo em tanque tipo *raceway*

<i>Spirulina platensis</i> LEB 52	Cultivo em tanque tipo <i>raceway pond</i>	
	Fase estacionária	Fase de declínio
<b>Proteína (%)</b>	39,86±0,92 <sup>a</sup>	28,42±2,11 <sup>b</sup>
<b>Carboidratos (%)</b>	22,05±7,76 <sup>a</sup>	28,31±0,95 <sup>a</sup>
<b>Lipídios (%)</b>	2,28±0,21 <sup>a</sup>	2,48±0,20 <sup>a</sup>
<b>Umidade (%)</b>	9,32±0,15 <sup>a</sup>	6,76±0,13 <sup>b</sup>
<b>Produtividade em Carboidratos (mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	10,39±3,66 <sup>a</sup>	12,26±0,41 <sup>a</sup>
<b>Produtividade em Lipídios (mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>)</b>	1,07±0,10 <sup>a</sup>	1,07±0,08 <sup>a</sup>

Nos resultados valores seguidos de letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As produtividades em carboidratos, tanto na fase estacionária (10,39 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) quanto na fase de declínio (12,26 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) foram menores quando comparadas com a produtividade da mesma microalga em fotobiorreator fechado de 2 L utilizado na seleção (30,07 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>). A concentração final de biomassa também diminuiu no cultivo em tanque aberto e utilizando 50% de efluente de maltaria de 1,08 g.L<sup>-1</sup> na seleção utilizando 30% do efluente, para 0,74 g.L<sup>-1</sup> no aumento de escala. A diminuição dos parâmetros de crescimento pode ser justificada pela presença de amônia na amostra de efluente utilizada, visto que a microalga passou por adaptação ao efluente em ausência deste composto. Assim como a presença da amônia no cultivo, a intensidade luminosa influenciou no crescimento da *Spirulina*, o cultivo em tanque tipo *raceway* foi realizado com uma concentração de efluente maior, e portanto uma maior concentração de sólidos suspensos estavam presentes no meio. A quantidade de luz recebida pelas células está relacionada ao carbono que será fixado pela microalga, influenciando na taxa de crescimento das culturas microalgais (DERNER et al., 2006).

Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia, no mês de janeiro, período em que o cultivo em tanque aberto foi realizado, a insolação foi de cerca de 10 horas por dia, com temperaturas aproximadas de 28 °C (INMET, 2016). Apesar da luminosidade no período, o efluente de maltaria utilizado apresentava uma concentração de 761 mg.L<sup>-1</sup> de sólidos suspensos totais, conferindo turbidez ao meio, prejudicando a captação de luz por organismos fotossintetizantes, diminuindo o crescimento celular (SANT'ANNA JR., 2010).

Além de influenciar no crescimento, a energia luminosa possibilita a síntese de carboidratos a partir de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, por meio da redução do dióxido, que utiliza a energia

fornecida pelo ATP (adenosina tri-fosfato) e pelo NADH (nicotinamida adenosina difosfato reduzida) que são gerados na transferência fotossintética de elétrons. Gás carbônico e água, ao receberem energia luminosa, combinam-se para formar carboidratos e gerar oxigênio como subproduto (MOTTA, 2005).

A baixa absorção de luz prejudicou o acúmulo de carboidratos pela microalga, atingindo concentração de 22,05% na fase estacionária e 28,31% na fase de declínio.

Pode-se observar também, na Figura 6, que enquanto cresce a microalga diminui as concentrações de nitrato e fosfato no meio de cultivo. A maior diminuição ocorre na fase log, onde a microalga está adaptada ao meio e inicia um crescimento exponencial.

As microalgas consomem fósforo como um elemento essencial requerido na constituição celular de fosfolipídeos, nucleotídeos e ácidos nucléicos. Tipicamente, as células das microalgas têm aproximadamente 1% de fósforo em base seca, embora em certas condições, haja evidências que elas sejam capazes de retirar do meio, quantidades excedentes de fósforo para posterior utilização. Este fósforo extra é estocado na forma de fosfato para o uso como recurso interno quando as condições externas de fósforo são limitantes (MIYACHI et al., 1964).

As concentrações de nitrato no meio diminuem ao longo do cultivo, em contraste, as concentrações de fosfato aumentam nos 6 primeiros dias de cultivo, e a partir deste passam a ser removidos pela microalga.

O processo de remoção de fósforo é considerado um dos mais complexos bioprocessos empregados em tecnologia ambiental. O processo de remoção de fósforo pelas microalgas pode ser semelhante à remoção por bactérias, visto que a curva de remoção deste composto (Figura 6) é condizente com o processo realizado por estas. De modo geral, o funcionamento do processo baseia-se na transformação que ocorrem em ambiente anaeróbio e, posteriormente, em ambiente aeróbio ou anóxico. No caso da utilização do efluente de maltaria, a fase anaeróbia pode ter ocorrido pela presença de lodo na amostra, o que caracteriza a presença de microrganismos anaeróbios no cultivo. Além da presença de bactérias, uma agitação insuficiente no tanque pode levar ao acúmulo e decomposição anaeróbia da biomassa microalgal dentro do biorreator (GROBBELAAR, 2000).

Na etapa aneróbia ocorre a utilização de fonte externa de carbono e estocagem do carbono na forma de reserva constituída de poli-hidroxicanoatos, em conjunto com a degradação de polifosfatos e liberação de fosfato para o meio externo, podendo justificar o aumento nas concentrações de fosfato durante os primeiros dias de cultivo da microalga. Na etapa aeróbia ocorre o crescimento microbiano e absorção de fosfato repondo a reserva de

polifosfatos, assim como a utilização dos poli-hidroxicanoatos estocados como fonte de carbono e energia. A Figura 6 mostra que a remoção do fosfato ocorre na fase em que a microalga entra em crescimento exponencial, condizente com o processo realizado pelas bactérias. O nitrato presente pode ser utilizado como acceptor final de elétrons, sob condições anóxicas, mas o metabolismo é similar ao da etapa aeróbia. Em condições anóxicas a disponibilidade de energia é reduzida, o que acarreta menor crescimento microbiano (SANT'ANNA JR., 2010), podendo relacionar-se com a baixa concentração celular da microalga ao final do cultivo, sendo que o efluente utilizado apresentava milivoltagem negativa, portanto um ambiente redutor, com elevada concentração de matéria orgânica. Com o crescimento celular e conseqüentemente diminuição na carga orgânica através da utilização dos nutrientes pela microalga o ambiente torna-se oxidante, proporcionando a remoção simultânea de nitrogênio e fósforo presentes no meio.

Entre os fatores que influenciam na remoção de fósforo, a temperatura é um limitante importante, já que é uma variável geográfica que afeta a taxa metabólica de todos os processos biológicos (SAKAMOTO et al., 1997). A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou remoção de 82,32% de fosfato quando cultivada em tanque tipo *raceway* com temperatura controlada entre 20°C e 35°C. Estudos sugerem que microalgas assimilam compostos fosfatados com maior eficiência, com valores ótimos de temperatura na faixa de 20 °C a 30 °C (HEALEY, 1982; VIEIRA, 2012). A concentração final de fosfato presente no meio foi de 1,66 mg.L<sup>-1</sup>, acima do limite permitido pela legislação para ser lançado, mas com eficiência de remoção superior a 75%, aceito pela legislação (CONSEMA, 2006).

A remoção de nitrato foi de 47,95%, com concentração final de 19,52 mg.L<sup>-1</sup>. Com a diminuição de fosfato do meio, a capacidade de remover nitrato pela microalga foi afetada, já que há a necessidade de uma disponibilidade dos dois nutrientes no meio (N e P), para que as microalgas removam eficientemente os compostos nitrogenados e fosfatados (BEUCKELS et al., 2015).

O cultivo de microalgas para a produção de biocombustíveis tem sido realizado em escala laboratorial. O custo de capital de um sistema de produção de biocombustíveis depende do projeto, incluindo o cultivo, a colheita e a extração dos produtos de interesse. A maioria das empresas optam por construir grandes operações de cultivo ao longo das zonas costeiras, a fim de utilizar a água do mar como principal fonte de água, reduzindo assim o custo com a utilização de água potável (SINGH et al., 2011). Em grande escala, os processos de separação da biomassa, como filtração, sedimentação, centrifugação ou floculação podem ser tecnicamente e economicamente exigentes. Porém as altas produtividades em lipídios e

carboidratos que as microalgas proporcionam, tornam o cultivo favorável para a produção de biocombustíveis.

Algumas das vantagens de se utilizar as microalgas como matéria-prima para a produção dos biocombustíveis são: (1) microalgas não competem com culturas alimentares por terras aráveis; (2) crescem rapidamente; (3) têm a capacidade de fixar dióxido de carbono, reduzindo assim as emissões de gases de efeito estufa; (4) podem utilizar nutrientes da maioria das águas residuárias, proporcionando um método alternativo para o tratamento de efluentes; e (5) após a extração dos produtos de interesse, como lipídios e carboidratos, ainda podem ser utilizados os pigmentos e a proteína da biomassa (SPOLAORE et al., 2006).

Em meio ao predomínio de matérias-primas para a produção de biocombustíveis, como a cana de açúcar, milho e soja, o setor de bioenergia vive uma expectativa pela consolidação das microalgas como fonte viável de biomassa para a produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007). A criação de políticas e estratégias, incluindo a seleção de matéria-prima e os investimentos, devem ser levados em consideração para a capacidade real de cada país, para que a implantação de cultivos microalgais visando a produção de biocombustíveis de terceira geração seja economicamente e ambientalmente sustentável.

## 5 CONCLUSÕES

A utilização do efluente de maltaria pré tratado por processo biológico, contribuiu para o aumento nas concentrações de carboidratos das biomassas microalgais. A microalga *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou uma concentração de 30,07% de carboidratos na etapa de seleção e 28,31% no cultivo em tanque *raceway*. Esses carboidratos são atrativos à produção de biocombustíveis de terceira geração, sendo uma alternativa frente à competição por terras aráveis para a produção de biocombustíveis de primeira e segunda geração.

As cianobactérias estudadas (*Spirulina platensis* LEB 52, *Spirulina platensis* Paracas e *Synechococcus nidulans*) apresentaram os maiores crescimentos, e por consequência da utilização dos nutrientes presentes no meio e no efluente, acarretaram numa maior remoção dos poluentes (nitrato e fosfato), mostrando-se eficientes na remoção dos mesmos. A *Spirulina platensis* LEB 52 apresentou remoções de 93,13% para nitrato e 89,76% para fosfato, a *Spirulina platensis* Paracas apresentou remoções de 70,72% de nitrato e 77,67% de fosfato e a microalga *Synechococcus nidulans* apresentou remoções de 80,33% e 83,04% para nitrato e fosfato, respectivamente.

A *Spirulina platensis* LEB 52, apresentou remoções satisfatórias, tanto em cultivo em fotobiorreator fechado, quanto em cultivo em tanque aberto (47,95% de nitrato e 82,32% de fosfato no aumento de escala), acarretando em um efluente com concentrações de fosfato dentro dos limites permitidos pela legislação para serem lançados ao meio ambiente, sem contribuir com a poluição de corpos receptores. Sendo assim, é uma alternativa ao tratamento físico-químico convencional utilizado nas estações de tratamento de efluente de maltaria.

Apesar do cultivo de microalgas em grande escala ainda apresentar limitações, e custos elevados, estratégias como a utilização de água não potável e de águas residuárias são alternativas para viabilizar o processo, diminuindo custos com a utilização da água e nutrientes para o meio de cultivo. O efluente de maltaria utilizado neste estudo, mostrou-se promissor como fonte de nutrientes para o cultivo de diferentes gêneros de microalgas, podendo-se diminuir a adição dos nutrientes usualmente utilizados nos meios de cultivo.

## REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; CID, A.; FIDALGO, P. **Microalgas**: cultivo y aplicaciones. 1ª ed. Espanha. Universidade de Coruña. 210 p, 1995.

ABDELAZIZ, A. E. M.; LEITE, G. B.; HALLENBECK, P. C. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. **Environmental Technology**, v. 34, p. 1783-1805, 2013.

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 257-275, 2012.

AHN, Y. Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. **Process Biotechnology**, v. 41, p. 1709-1721, 2006.

ALLEN, M. M.; STANIER, R. Y. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. **Journal of General Microbiology**, v. 51, p. 203-209, 1968.

ALMEIDA, E.; REGINA, M.; APARECIDA, M. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

ANA. Agência Nacional de Águas. **Água na medida certa**: a hidrometria no Brasil, 2012, 72 p.

AOAC. Official Methods of Analysis Association. **Method 923.05**, 1995, 15 p.

AOAC - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th HORWITZ, W.; ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2005.

APHA. American Public Health Association. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**, 1995. 541 p.

APT, K. E.; BEHRENS, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, n. 35, p. 215-226, 1999.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64-70, 2006.

BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In: BOROWITZKA, M. A. & BOTOWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 222-255.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, 1994, 301 p.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: **Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phyecology**. Blackwell Publishing, p. 312-351, 2004.

BEUCKELS, A.; SMOLDERS, E.; MUYLAERT, K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. **Water Research**, v. 77, p. 98-106, 2015.

BICH, N. N.; YAZIZ, M. I.; BAKTI, N. A. K. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. **Water Research**, v. 33, p. 2357-2362, 1999.

BOBBAN, S.; GRINSON, G. Algal biorefinery – based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon – smart world. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2-13, 2011.

BÖGER, P.; ERNEST, A.; CHEN, T. W. Carbohydrate formation in rewetted terrestrial cyanobacteria. **Oecologia**, v. 72, p. 574-576, 1987.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313-321, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/clima/energia/energias-renovaveis/biocombustiveis>. Acesso em: 22 out. 2014.

BRATBY, J. **Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment**. 2 ed. Vol. 5. Water Intelligence Online, 2006.

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

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360-369, 2013.

CARON, D. A.; GARNEAU, M. E.; SEUBERT, E.; HOWARD, M. D. A.; DARJANY, L.; SCHNETZER, A.; CETINIC, I.; FILTEAU, G.; LAURI, P.; JONES, B.; TRUSSEL, S. Harmful algae and their potential impacts on desalination operations off southern California. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 385-416, 2010.

CERÓN GARCIA, M. C.; SÁNCHEZ MIRÓN, A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E.; GARCÍA CAMACHO, F. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 297-305, 2005.

CHANG, I. S.; KIM, S. N. Wastewater treatment using membrane filtration – effect of biosolids concentration on cake residence. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1307-1314, 2005.

CHANG, Y.; WU, Z.; BIAN, L.; FENG, D.; LEUNG, D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine. **Applied Energy**, v. 102, p. 427-431, 2013.

CHARLES, M. B.; RYAN, R.; RYAN, N.; OLORUNTOBA, R. Public policy and biofuels: the way forward?. **Energy Policy**, v. 35, p. 5737-5746, 2007.

CHEN, C.; ZHAO, X.; YEN, H.; HO, S.; CHENG, C.; LEE, D.; BAI, F.; CHANG, J. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, n. 78, p.1-10, 2013.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

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

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 55-59, 2004.



COLLOS, Y.; BERGES, J. A. **Nitrogen metabolismo in phytoplankton**. Oxford: EOLSS Publisgers, 2004.

CONSEMA. Resolução nº 128/ 2006: Dispõe sobre a fixação de Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul. **Diário Oficial do Estado**, Porto Alegre, 07 dez. 2006.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modeling os *Spirulina platensis* growth in fresch water using resonse surfasse methodology. **World J. Microb. Biot.**, v. 18, p. 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. D. The role biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2-9, 2011.

COUTTEAU, P. **Micro-algae**. In: LAVENS, P.; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for quaculture. FAO Fisheries Technical Paper, n. 361, Rome, FAO, 1996, 295 p.

CRITES, R.; TCHOBANOGLIOUS, G. **Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones**. Bogotá, Colômbia: McGrae-Hill Interamericana S. A., 2000, 776 p.

DAL MAGRO, C.; DEON, M. C.; THOMÉ, A.; PICCIN, J. S.; COLLA, L. M. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1139-1145, 2013.

DALY, R.; HO, L.; BROOKES, J. D. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subseguente microcystin release and degradation. **Environmental Science & technology**, v. 41, n. 12, p. 4447-4453, 2007.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-337, 2005.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biobuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738-2749, 2010.

DEMIRBAS, A; DEMIRBAS, M. F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 1, p. 163-170, 2011.

DEPRAETERE, O.; FOUBERT, I.; MUYLAERT, K. Decolorisation of piggery wastewater to simulate the production of *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 366-372, 2013.

DERNER, R. N.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DOE. **Office of the biomass program, energy efficiency and renewable energy**, US Department of Energy, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

EUROPEAN COMMISSION. **Food, drink and milk industries**. Integrated Pollution Prevention and Control, 2006, 638 p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 22, p. 497-509, 1957.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 504-511, 2000.

FUCHS, W.; THEISS, M.; BRAUN, R. Influence of standard wastewater parameters and pre-flocculation on the fouling capacity during dead end membrane filtration of wastewater treatment effluents. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 1, p. 46-52, 2006.

FURLAN, V. J. M.; MARGARITES, A. C. F.; MOREIRA, J. B.; SCHMIDT, V. W.; COSTA, J. A. V. **Quantificação de carboidratos em microalgas**. In: XXIII Congresso Regional de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia (Cricte), 2009, Joinville/SC.

GODWIN-SAAD, E.; HALL, S.; HUGHES, D. **Abstract of 67<sup>th</sup> Annual Conference & Exposition on Surface Water Quality & Ecology**, Illinois, EUA, 1994.

GOKHALE, S. V.; JYOTI, K. K.; LELE, S. S. Modeling of chromium (VI) biosorption by immobilized *Spirulina platensis* in packed column. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2-3, p. 735-743, 2009.

GOLUEKE, C.; OSWALD, W.; GOTAAS, H. Anaerobic digestion of algae. **Applied Microbiology**, v. 5, p. 47-55, 1957.

GONZÁLES-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Microalgae autoflocculation: na alternative to high-energy consuming harvesting methods. **Journal of Applied Physiology**, v. 25, p. 991-999, 2013.

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**, v. 60, p. 259-262, 1997.

GRIFFITHS, E. W. **Removal and utilization of wastewater nutrientes for alage biomass and biofuels**. 2010. 72 f. Dissertação (Master of Science in Biological Engineering), Utah State University, Logan, 2010.

GROBBELAAR, J. U. Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. **Journal of Applied Phycology**, n. 12, p. 201-206, 2000.

GROBBELAAR, J. U. Algal biotechnology: real opportunities for África. **South African Journal of Botany**, n. 70, p. 140-144, 2004.

GUTTERRES, M.; AQUIM, P. M. Wastewater reuse focused on industrial applications. **Wastewater Reuse and Management**, p. 127-164, 2012.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.; M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037-1047, 2010.

HEALEY, F. P. Phosphate. In: CARR, N. G.; WHITTON, B. A. **The biology of cyanobacteria**. Berkeley: University of California Press, 1982.

HOFFMAN, J. P. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. **Journal of Phycology**, v. 34, p. 757-763, 1998.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBET, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.**, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

HUGO, V. P. V.; JULIÁN, M. P. C.; ROSA, O. C. V. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. **Chemosphere**, v. 64, p. 1-10, 2006.

INMET. **Instituto Nacional de Meteorologia**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home2/index>. Acesso em: abril de 2016.

JASVINDER, S.; GU, S. Biomass conversion to energy in India – A critique. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1367-1378, 2010.

JIANG, L.; PEI, H.; HU, W.; JI, Y.; HAN, L.; MA, G. The feasibility of using complex wastewater from a monosodium glutamate factory to cultivate *Spirulina subsalsa* and accumulate biochemical composition. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 304-310, 2015.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C., A. **Tratamento de esgotos domésticos**. ABES, 1995, 720 p.

KLAUSMEIER, C. A.; LITCHMAN, E.; DAUFRESNE, T.; LEVIN, S. S. Optimal nitrogen to phosphorus stoichiometry of phytoplankton. **Nature**, v. 429, p. 171-174, 2004.

LEE, K.; LEE, C. G. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 194-199, 2001.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; CALERO, D. N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology**, v. 24, p. 825-820, 2008.

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

LOLADZE, I.; ELSER, J. J. The origins of the Redfield nitrogen to phosphorus ratio are in a homeostatic protein to rRNA ratio. **Ecology Letters**, v. 14, p. 244-250, 2011.

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

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenil reagent. **J. Biol. Chem.**, n. 193, p. 265-275, 1951.

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; McBRIDE, L. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Curr Opin Biotechnol**, v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADHU, P.; NEELAM, G.; KONINIKA, M.; SUTAPA, B. Microalgae in removal of heavy metal and organic pollutants from soil. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, v. 23, p. 521-539, 2014.

MAGUER, J. F.; L'HELGUEM, S.; MADEC, C. Nitrogen Uptake and Assimilation Kinetics in *Alexandrium minutum* (Dinophyceae): Effect of N – Limited Growth Rate on Nitrate and Ammonium Interactions. **Journam of Phycology**, n.43, p.295-303, 2007.

MANRICH, A.; MERMEJO, B. D. C.; MORAES, J. C.; OLIVEIRA, J. E. D.; MATTOSO, L. H. C.; MARTINS, M. A. Determinação da composição química da *Spirulina platensis*. **VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio**, 2014.

MARGARITES, A. C. F.; COSTA, J. A. V. Incremento f carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, p. 80-86, 2014.

MASROOR, M.; MEHREVAR, M.; EIN-MOZAFFARI, F. Na Overview of the Integration of Advanced Oxidation Technologies And Other Processes For Water And Wastewater Treatment. **Internation Journal of Engineering**, v. 3, n. 2, p. 120-146, 2009.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and othe applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

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

MESS, J. B. R.; GOMES, S. D.; VILAS BOAS, M. A.; FAZOLO, A.; SAMPAIO, S. C. Removal of organic matter and nutrients from slaughterhouse wastewater by using *Eichhornia crassipes* and evaluation of the generated biomass composting. **Engenharia Agrícola**, v. 29, p. 466-473, 2009.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: treatment, disposal and reuse**. New York: McGraw-Hill, 2003. 1334 p.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: treatment, disposal, reuse**. 3 ed., Singapore: McGraw-Hill Int., 1991.

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

MIERZWA, J. C.; HESPANHOL, I. **Água na Indústria – Uso Racional e Reuso**. 1ª ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2005.

MILLER, G. L. Use of the dinitrosalicylic and reagente for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MILLER, S. R.; MARTIN, M.; TOUCHTON, J.; CASTENHOLZ, R. W. Effects of nitrogen availability on pigmentation and carbono assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain SH-94-5. **Archives of Microbiology**, n. 177, p. 392-400, 2002.

MIYACHI, S.; KANAI, R.; MIHARA, S.; MIYACHI, S.; AOKI, S. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 93, n. 3, p. 625-634, 1964.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy Policy**, v. 63, p. 114-122, 2013.

MONA, S. Sustainable algal biomass products by cultivation in waste water flows. **VTT Technology**, v. 147, 88 p., 2013.

MORENO, L. R.; RAMÍREZ, R. O. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. **Interciência**, v. 31, n. 9, p. 657-663, 2006.

MORITA, D. M.; PIVELI, R. **Remoção de nutrientes**. Apostila do curso de controle de poluição, JICA, 1998.

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. **Nutrientes de esgoto sanitário**: utilização e remoção. Rio de Janeiro: ABES. 430 p, 2009.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Básica**. EDUCS, 2005.

NOÛE, J. D.; LALIBERTÉ, G.; PROULX, D. Algae and waste water. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 247-254, 1992.

NREL. **National renewable energy laboratory**. Biomass research – What is a biorefinery?. Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>. Acesso em abril 2016.

NUNES, J. A. **Tratamento físico químico de águas residuárias industriais**. 4 ed. Aracajú: Gráfica Editora J. Andrade Ltda, 2004.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of process for eficiente light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 201-207, 2000.

OLGUÍN, E. J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutriente removal processes. **Biotechnol Adv.**, v. 22, p. 81-91, 2003.

PEARSON, M. J. **Toxic blue-green algae**. 1 ed. Londres: National Rivers Authority Water Quality, 1990, 120 p.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potencial products. **Water Research**, v. 45, p. 11-36, 2011.

PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; YEOH, B. G.; HASHIM, M. A. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 395-400, 2000.

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

PROCHÁZKOVÁ, G.; BRÁNYIKOVÁ, I. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 1359-1377, 2014.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; VIEIRA, J. A. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina* sp. LEB-18 com adição noturna de diferentes fontes de carbon orgânico. **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Natal – RN, 2009.

RAMALHO, R. S. **Tratamiento de águas residuales**. Barcelona: Editorial Reverté S.A., 1991, 705 p.

RAVEN, J. A. Sensing pH?. **Plant, Cell and Environment**, v. 13, p. 721-729, 1990.

RICHARDS, J. S.; NICHOLAS, A. P.; YI, H.; ROCKY, N. Sustainable sources of biomass for bioremediation of heavy metals in waste water derived from coal-fired power generation. **Plos One**, v. 7, 2012.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture**: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science, p. 97-115, 2004.

RIPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, n. 111, p. 1-61, 1979.

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

ROGERS, K. Fungi, **Algae and Protists**. New York: Britannica, 2005.

RUIZ, J.; ÁLVAREZ, P.; ARBIB, Z.; GARRIDO, C.; BARRAGÁN, J.; PERALES, J. A. Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. **Int. J. Phytoremediation**, v. 13, p. 884-896, 2011.

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

SAKAMOTO, T.; SHEN, G.; HIGASHI, S.; MURATA, N.; BRYANT, D. A. Alteration of low-temperature susceptibility of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 by



genetic manipulation of membrane lipid unsaturation. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 1, p. 20-28, 1997.

SANT'ANNA JR., G., L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 398 p, 2010.

SANTOS, M. S.; RIBEIRO, F. M. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005.

SCHMID-STAIGER, U. Algae biorefinery – concepts. **National German Workshop on Biorefineries**, Worms, 2009.

SCHMIDEL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, 254 p.

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R. A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. H. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1238-1240, 2008.

SEKER, A.; SHAHWANT, T.; EROGLU, A. E.; YILMAZ, S.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead (II), cadmium (II), and nickel (II) ions on *Spirulina platensis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1-3, p. 973-980, 2008.

SHEN, Q. H.; JIANG, J. W.; CHEN, L. P.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; CHEN, H. L. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 257-263, 2015.

SHIFRIN, N. S.; CHISHOLM, S. W. Phytoplankton lipids; interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. **Journal of Phycology**, v. 17, p. 374-384, 1981.

SIMIÃO, J. **Gerenciamento de resíduos sólidos industriais em uma empresa de usinagem sobre o enfoque da produção mais limpa**. 2011. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10-16, 2011.

SMITH, V. H.; STURM, B. S. M.; DENOYELLES, F. J.; BILLINGS, S. S. The ecology of algal biodiesel production. **Trends in Ecology & Evolution**, V. 25, P. 301-309, 2010.

SORDA, G.; BANSE, M.; KEMFERT, C. An overview of biofuel policies across the world. **Energy Policy**, v. 38, p. 6977-6988, 2010.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; MUSSGNUG, J. H.; WAGNER, L. D.; BOROWITZKA, M. A.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Future prospects of microalgae biofuel production systems. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 554-564, 2010.

TEDESCO, M A.; DUERR, E. O. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. **Applied Phycology**, v. 1, n. 3, p. 201-209, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006.

TRAVIESO, L.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R.; LEÓN, M.; RAPOSO, F.; RINCÓN, B. Assesment of a microalgae pond for post treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. **Environmental Technology**, v. 29, p. 985-992, 2008.

TROSTLE, R. Global Agricultural Supply and Demand: Factors Contributing to the Recent Increase in Food Commodity Prices. **United States Department of Agriculture**, p. 1-30, 2008.

UGWU, C.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4021-4028, 2008.

VANNELA, R.; VERMA, S. K.  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , and  $\text{Zn}^{2+}$  accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 5, p. 1282-1293, 2006.

VENKATARAMAN, K.; MADHAVI-DEVI, K.; MAHADEVAS-WAMY, M.; MOHAMMED-KUNHI, A. A. Utilization of rural wastes for algal biomass production with *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* in India. **Agriculture Wastes**, v. 4, p. 117-130, 1982.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. E. Algas: da economia nos Ambientes Aquáticos à Biorremediação e à Química Analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VIEIRA, J. G.; LOPES, E. J.; MANETTI, A. G. S.; QUEIROZ, M. I. Influência da temperatura na remoção de fosfato por microalgas em biorreatores heterotróficos. **Revista Ambiente & Água**, v. 7, n. 2, p. 101-109, 1012.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2 ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

WARR, S. R. C.; REED, R. H.; STEWART, W. D. P. Carbohydrate accumulation in osmotically stressed cyanobacteria (blue-green algae): interactions of temperature and salinity. **New Phytologist**, v. 100, p. 285-292, 1985.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of applied microbiology University of Tokyo. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 6, p. 1-4, 1960.

WATRAS, C. J.; HUCKABEE, J. W. **Mercury Pollution Integration and Synthesis**, 1<sup>a</sup> ed. Lewis: Boca Raton, 1994.

WOERTZ, I.; FEFFER, A.; LUNDQUIST, T.; NELSON, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, v. 135, p. 1115-1122, 2009.

WU, Y.; LIU, W.; GAO, N.; TAO, T. A study of titanium flocculation for water treatment. **Water research**, v. 45, p. 3704-3711, 2011.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6. P. 87-102, 2000.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. 1966. Tese (Ph.D), Universidade de Paris, Paris, 1966.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 7107-7111, 2010.

ZHANG, C.; ZHANG, Y.; ZHUANG, B.; ZHOU, X. Strategic enhancement of algal biomass, nutrient uptake and lipid through statistical optimization of nutrient supplementation in coupling *Scenedesmus obliquus* – like microalgae cultivation and municipal wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 171, p. 71-79, 2014.

ZHU, L. D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; SHONG, J. J.; YUAN, Z. H.; WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 30, p. 1035-1046, 2014.

ZHU, S.; HUANG, W.; XU, J.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalgae *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 292-298, 2014.

## ANEXO A – Meio Zarrouk

Meio Zarrouk

Tabela 1: Quantidades (g) de reagentes para preparo do meio Zarrouk.

Componente	g.L <sup>-1</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
NaCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0,08

Tabela 2: Quantidades (mL) das soluções para o meio Zarrouk.

Solução	mL.L <sup>-1</sup>
A <sub>5</sub>	1,0
B <sub>6</sub>	1,0

**Solução A<sub>5</sub>:** 2,86 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g.L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,222 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,079 g.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,015 g.L<sup>-1</sup> de NaMoO<sub>4</sub>.

**Solução B<sub>6</sub>:** 22,96 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>; 96 mg.L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>.24H<sub>2</sub>O; 47,85 mg.L<sup>-1</sup> de NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 17,94 mg.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 61,1 mg.L<sup>-1</sup> de TiOSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.8H<sub>2</sub>O; 43,98 mg.L<sup>-1</sup> de CO(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.

## ANEXO B – Meio Bristol’S Modificado (MBM)

Meio Bristol’S Modificado (MBM)

Tabela 3: Quantidades (g) de reagentes para preparo do meio MDM.

Componente	g.L <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	0,25
CaCl <sub>2</sub>	0,01
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,175
NaCl	0,025
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,02

Tabela 4: Quantidades (mL) das soluções para o meio MBM.

Solução	mL.L <sup>-1</sup>
A <sub>5</sub>	1,0

**Solução A<sub>5</sub>:** 2,86 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g.L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,222 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,079 g.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,015 g.L<sup>-1</sup> de NaMoO<sub>4</sub>.

## ANEXO C – Meio BG-11

Meio BG-11

Tabela 4: Quantidades (g) de reagentes para preparo do meio BG-11.

Componente	g.L <sup>-1</sup>
NaNO <sub>3</sub>	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036
Citrato férrico amoniacal	0,006
EDTA dissódico	0,001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02
Ácido cítrico	0,006

Tabela 5: Quantidades (mL) das soluções para o meio BG-11.

Solução	mL.L <sup>-1</sup>
A <sub>5</sub> +Co	1,0

**Solução A<sub>5</sub>+Co:** 2,86 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g.L<sup>-1</sup> de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,222 g.L<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,079 g.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,015 g.L<sup>-1</sup> de NaMoO<sub>4</sub>; 0,0494 g.L<sup>-1</sup> de Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.