



**DANIELE LAIS PEREIRA**

**CULTIVO DE MICROALGAS EM ESGOTO SANITÁRIO**

**LAVRAS – MG  
2019**

**DANIELE LAIS PEREIRA**

**CULTIVO DE MICROALGAS EM ESGOTO SANITÁRIO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de licenciando.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi  
Orientadora

**LAVRAS – MG  
2019**

**DANIELE LAIS PEREIRA**

**CULTIVO DE MICROALGAS EM ESGOTO SANITÁRIO**  
***CULTIVATION OF MICROALGAS IN SANITARY SEWAGE***

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de licenciando.

APROVADA em 05/12/2019

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Paula Peixoto Assemany

UFLA

Dra. Aline dos Reis Souza

UFLA

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi  
Orientadora

**LAVRAS- MG**  
**2019**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar me guiando sempre e guardando meus passos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de estudo e pesquisa.

À minha orientadora, Dra. Luciene Alves Batista Siniscalchi, pelo empenho dedicado à elaboração do trabalho e pela ajuda.

Ao meu pai, (*in memorian*), que lá do céu, me concedeu forças para continuar lutando e chegar até aqui.

À minha mãe, por ser uma pessoa incrível e nunca ter medido esforços para me ver feliz e realizada.

À minha avó, pelas orações de sempre e pelo seu imenso amor.

Às minhas irmãs, Camily e Alice, pelo amor tão sincero.

À minha amiga, Carol, por estar comigo, compartilhando de seus conhecimentos e que muito me ajudou durante o desenvolvimento do projeto, você foi um anjo em minha vida.

Às minhas amizades que estiveram comigo, me ajudando a superar cada momento.

Gratidão, à toda minha família e amigos.

## RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares, presentes em uma grande variedade de ecossistemas, com capacidade de crescimento sob condições autótrofa, heterótrofa ou mixotrófica. Destaca-se, além da importância fotossintetizante, o potencial biotecnológico desses microrganismos, principalmente, no uso da biomassa sob diferentes aspectos energéticos. Dentre os meios alternativos utilizados para a produção de biomassa, destaca-se as águas residuárias, ricas em nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. Nesse sentido, esse trabalho teve como objetivo cultivar microalgas a partir de efluente de um reator anaeróbio tratando esgotos domésticos. Para a realização do cultivo de microalgas, foram coletados 40L de efluente anaeróbio do reator UASB da ETE/UFLA, o qual foi adicionado em um tanque de fibra de vidro com altura da lâmina d'água de 18cm permanecendo sob a luz solar por 15 dias (cultivo 1). A partir da cultura selecionada no tanque, realizou-se cultivos em laboratório, em duplicata, utilizando 10% do inoculo, 45% de meio de cultura BG-11 e 45% de efluente (cultivo 2). O cultivo controle (cultivo 2') também foi realizado, onde utilizou-se a mesma proporção de inoculo e 90% do meio de cultura BG-11. O controle das culturas e a densidade celular foi obtida a partir da contagem diária em câmara de Neubauer dos cultivos ao longo de 10 dias. Para o cultivo 1, obteve-se uma média de crescimento de microalgas igual a  $2,2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , mostrando microrganismos diversos e células típicas de *Chlorella* identificadas por microscopia óptica e MEV. Para o cultivo 2 e 2', mostrou-se, respectivamente uma média de crescimento igual a  $2,2 \times 10^6$  e  $4,5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Os resultados mostram que o cultivo com o uso de efluentes foi capaz de selecionar biomassa algal e permitir a assimilação de macronutrientes melhorando o crescimento, conforme observado pelo maior rendimento celular com o uso de efluentes quando comparado ao cultivo controle. O uso de efluentes como um meio nutritivo para as microalgas é relevante, uma vez que utiliza uma água residuária, reduzindo o impacto de lançamento e possibilitando o aproveitamento dos compostos diluídos no efluente. As microalgas são potencialmente sustentáveis e constituem um grupo peculiar de microrganismos que crescem rapidamente devido à sua estrutura simples, o que ressalta a viabilidade do seu uso como fonte para produção de bioenergia em substituição à plantas em função da sazonalidade. Nesse sentido, maiores estudos ainda são requeridos no sentido de aprimorar tal técnica e buscar efluentes que tenham um potencial no sentido de cultivo de microrganismos.

**Palavras-chave:** Biotecnologia. Águas residuárias. Densidade celular. *Chlorella*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Sistemas de cultivo de microalgas: (a) lagoa raceway; (b) fotobiorreator de placas (Bitog et al., 2011).....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Reator do tipo UASB de número 2.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Reservatório de fibra de vidro.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Estufa utilizada para desenvolvimento dos cultivos.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Concentração de células no cultivo 1 e 2.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Concentração de células em LOG no cultivo 1 e 2.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Concentração de células no cultivo 1 e 2.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Concentração de células em LOG no cultivo 1 e 2.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Imagem de microscopia óptica, microalga <i>Chlorella</i> (x40).....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Imagem de MEV, microalga <i>Chlorella</i> (x4800).....</b>	<b>30</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>07</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>09</b>
<b>2.1</b>	<b>Impacto do lançamento de águas residuárias.....</b>	<b>09</b>
<b>2.2</b>	<b>Tratamento anaeróbio dos esgotos.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3</b>	<b>Algas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Diversidade de microalgas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Cultivo de microalgas.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4</b>	<b>Biocombustíveis.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Efluente.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Cultivos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Clorofila.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Crescimento em tanque de cultivo instalado na ETE-UFLA.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Cultivo em laboratório com fotoperíodo.....</b>	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares e microscópicos de vida livre predominante em diferentes ambientes, fotoautótrofos ou quimioheterotróficos, importantes para o equilíbrio do ecossistema e com papel chave, na formação do oxigênio para a atmosfera terrestre. Tais microrganismos são capazes de crescer em ambientes que disponibilizam fontes de nutrientes, como os macronutrientes, fósforo e nitrogênio, que limitam o crescimento desses organismos.

São organismos com exigência simples para crescimento, mas uma mesma espécie de microalga pode apresentar perfil de crescimento distinto, de acordo com as condições de cultivo empregadas. As microalgas podem crescer autotroficamente utilizando luz e dióxido de carbono. Também podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, utilizando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou, ainda, em sistema de cultivo mixotrófico, processo metabólico no qual a fotossíntese é a principal fonte de energia, embora os compostos orgânicos e o dióxido de carbono são essenciais.

Os sistemas de cultivo podem ser abertos ou fechados. Em sistemas abertos, as culturas são desenvolvidas, principalmente, em tanques (tipo *raceway*) que são denominados sistemas abertos porque parte da cultura (superfície) está em contato com o ar atmosférico. Os cultivos são mantidos e expostos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação. Os tanques são geralmente pouco profundos (0,3 – 1,0 m), construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato. O outro sistema de cultivo, fechado, em fotobiorreator, é mais sofisticado. É, geralmente, de tubos plásticos, vidro ou policarbonato, distribuídos em painéis de forma achatada ou em serpentinas. Um aspecto muito interessante dos fotobiorreatores é a possibilidade de controlar as condições de cultivo. Dessa forma, a concentração de nutrientes, temperatura, luz e pH podem ser ajustados para a obtenção de maior biomassa em um menor período.

São muitos os possíveis usos dos cultivos de microalgas, sendo que a biomassa produzida destina-se às mais diversas aplicações, tais como na alimentação humana e animal na forma de suplementos alimentares, na indústria de cosméticos, no tratamento de águas residuárias e também como fonte para a produção de biocombustíveis.

A utilização da biomassa de microalgas para produção de biocombustíveis vem sendo vista como uma alternativa promissora, uma vez que o seu cultivo proporciona produtividades em carboidratos e lipídios superiores às matérias primas vegetais convencionalmente utilizadas na obtenção de etanol e biodiesel.

A possibilidade de utilizar nutrientes presentes em efluentes de tratamento do esgoto doméstico pode reduzir os custos e aumentar a produção de biomassa de microalgas e ainda evitar a eutrofização nos corpos d'água receptores.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo cultivar e isolar microalgas em escala de laboratório sob condições de fotoperíodo e temperatura controlada, a partir do efluente proveniente de um reator UASB (reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo) da Estação de Tratamento de Esgotos da Universidade Federal de Lavras (ETE-UFLA), no qual o efluente foi parte do suplemento requerido pelas microalgas, utilizado como inóculo e também como alimento aos microrganismos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Impacto do lançamento de águas residuárias

A necessidade do abastecimento de água é inerente à história da humanidade. Assim, com o passar do tempo está crescendo as exigências em termos de qualidade e quantidade. A água apropriada para consumo deve passar por estações de tratamento de água (ETAs), para que possa atender aos padrões de potabilidade para abastecimento e usos mais nobres.

As ações antrópicas ocasionam uma série de perturbações nos ambientes aquáticos. O uso inadequado dos recursos hídricos, em decorrência do desenvolvimento de atividades agrícolas e industriais, aliado a fatores relativos à urbanização desordenada e ao crescimento populacional, tem provocado, de forma abrangente, a poluição dos mananciais superficiais (BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010). Diante disto, às questões ambientais se tornam preocupantes, pois os recursos naturais estão se tornando escassos perante as atividades industriais e isso faz com que aumente os resíduos gerados. A importância de se preservar os recursos hídricos, se torna cada vez mais relevante.

A contribuição de esgotos depende, em geral, do abastecimento de água, havendo, portanto, inconfundível correlação entre o consumo de água e a contribuição para a rede de esgotos. No Brasil, tradicionalmente utiliza-se o consumo per capita de água para se projetar o sistema de esgotamento sanitário (TSUTIYA; ALEM SOBRINHO, 1999). O consumo per capita é um parâmetro extremamente variável, dependendo de diversos fatores, tais como a renda familiar e a localidade (VON SPERLING, 2017).

No entanto, a fração de esgotos que adentra a rede de coleta pode variar, devido ao fato de que parte da água consumida pode ser incorporada à rede pluvial (ex: rego de jardins e parques, lavagem de carro e outros) (VON SPERLING, 2017).

Os esgotos domésticos contêm aproximadamente 99,9% de água. A fração restante inclui sólidos orgânicos e inorgânicos, suspensos e dissolvidos, bem como microrganismos. Portanto é devido a essa fração de 0,1% que há necessidade de se tratar os esgotos (VON SPERLING, 2017). Além desses, macronutrientes e micronutrientes também estão contidos na água residuária e podem promover alterações no ecossistema.

Eutrofização é o enriquecimento do meio aquático com nutrientes, causando o crescimento de organismos e plantas aquáticas, tanto planctônicas quanto aderidas, que podem atingir níveis tais que sejam causadores de interferências aos usos desejáveis do corpo d'água.

Normalmente, o maior fator de preocupação são as algas, cujo crescimento depende do aporte de nutrientes como nitrogênio e fósforo (PROSAB, 2010).

O processo de eutrofização envolve a passagem de determinado ambiente aquático do estado oligotrófico (baixa produtividade) para mesotrófico (produtividade média) e eutrófico ou hipereutrófico (alta produtividade) (BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010).

A eutrofização apresenta uma série de consequências econômicas, e a ação antrópica vai acarretar em possíveis danos a saúde.

Além das microalgas, ocorre também o crescimento de cianobactérias, que tem potencial de contaminar ambientes aquáticos, uma vez que poderá produzir metabólitos tóxicos, como as cianotoxinas, capaz de ocasionar danos ao sistema nervoso central, fígado e/ou processos alérgicos (AZEVEDO; BRANDÃO, 2003).

## **2.2 Tratamento anaeróbio de esgotos**

Dentre os sistemas biológicos de tratamentos de esgoto, destacam-se os anaeróbios pela possibilidade de produção de metano na forma de biogás dentro da própria ETE. Os reatores UASB incluem amplas vantagens, principalmente no que diz respeito a requisitos de área, simplicidade e baixo custo de projeto, operação e manutenção (CHERNICHARO et al., 1999).

O reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), é um reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente de alta eficiência. Normalmente, é utilizado em processos secundários para estabilização da matéria orgânica inicial. Apresentam um grande avanço na aplicação da tecnologia anaeróbia para o tratamento direto de águas residuárias (CATUNDA; VAN HAANDEL, 1996; CHERMICHARO, 1997).

A água residuária proveniente do reator UASB constitui, em geral, nutrientes da principal fonte, e podem ser lançados nas águas o nitrogênio orgânico devido à presença de proteínas e nitrogênio amoniacal, devido à hidrólise sofrida pela ureia na água, sendo estes, nutrientes necessários para as microalgas.

## 2.3 Algas

### 2.3.1 Diversidade de microalgas

Microalgas são microscópicas (5-50  $\mu\text{m}$ ), cujas células possuem uma composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, etc.) e essa composição está relacionada à natureza de cada espécie de microalga, bem como aos fatores ambientais relacionados à região onde o cultivo está sendo realizado e suas condições e ao meio de cultura utilizado (MIAO; WU, 2006; ZAMALLOA et al., 2011). De acordo com Chist (2007) são responsáveis pela produção de cerca de 60% de oxigênio da Terra, mostrando sua importância ecológica evolutiva.

As algas são de um grupo polifilético, não coesivo e artificial de organismos que evoluíram de diferentes origens. Segundo Bicudo e Menezes (2006), o termo alga foi proposto por Lineu como uma categoria taxonômica, em 1753, no clássico trabalho *Species plantarum*. O número de espécies de algas foi estimado em cerca de dez milhões (ANDRADE et al., 2014).

As algas representam um grupo de organismos de grande diversidade morfofisiológica e genética, englobando indivíduos microscópicos e macroscópicos (ANDRADE et al., 2014). Na ficologia, o termo alga se refere a todo organismo que possui um talo não diferenciado em raiz, caule, folhas e moléculas de clorofila *a* em sua constituição, que possibilitam a realização de fotossíntese oxigênica (MUTANDA et al., 2011).

Clorofila *a* é um pigmento fotossensível presente em todos os órgãos fitoplânctons eucarióticos (algas) ou procarióticos (cianobactérias) e é utilizado como parâmetro de biomassa algal em vários estudos. A clorofila é encontrada em todas as células e está localizada em estruturas especiais, situadas no citoplasma, denominadas plastos, ou mais especificamente cloroplastos. O papel da clorofila, como também de outros pigmentos auxiliares da fotossíntese, consiste principalmente em absorver a luz e transformá-la em outra forma de energia que possa ser utilizada na síntese de compostos orgânicos (BRANCO, 1986). A determinação de fitoplâncton em corpos d'água é mais comumente feita pela medida da clorofila *a*. Isto porque a clorofila *a* é o principal pigmento fotossintético de todos os organismos que realizam a fotossíntese.

Como organismos fotossintéticos, as algas desempenham um papel importante na captura da energia solar e transformação desta em energia química (SILVA, 2014). As microalgas, em sua diversidade, são organismos muito flexíveis quanto ao habitat, sendo

encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres, quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada (LUÍZ et al., 2013).

Segundo Silva (2014) as microalgas têm um alto potencial biotecnológico, conseguem converter a energia luminosa e gás carbônico em biomassa em diferentes compostos orgânicos, sendo eles, proteínas, carboidratos, lipídeos, e pigmentos em um curto período de tempo. Elas apresentam altas concentrações de lipídeos, e podem servir de matéria prima para a fabricação de alguns produtos.

As microalgas podem ser cultivadas nos modos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, sendo que a diferença entre estas modalidades de cultivo está na fonte de energia e de carbono (LUÍZ et al., 2013). No cultivo autotrófico, mais especificamente, fotoautotrófico, as células obtêm energia da luz e o carbono do CO<sub>2</sub> do ar, produzindo então, através da fotossíntese, suas biomoléculas: polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. No cultivo heterotrófico, as células utilizam compostos orgânicos como fonte de energia e de carbono e, no mixotrófico, usam a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de energia e CO<sub>2</sub> e compostos orgânicos como fonte de carbono.

O cultivo de microalgas pela rota heterotrófica ou mixotrófica apresenta rendimento e concentração de lipídeos melhor que a rota autotrófica, visto que se verifica que a disponibilidade de luz é o fator limitante e a velocidade de crescimento cai durante a noite ou em áreas sombreadas durante o cultivo autotrófico e que no cultivo heterotrófico e/ou mixotrófico fontes orgânicas são usadas a noite para a manutenção das taxas de crescimento (KOLLER et al., 2012; MOHAMED et al., 2014).

A reprodução em algas é bastante diversificada e pode ocorrer de forma vegetativa, assexuada e sexuada. Acontece primariamente pela divisão de células vegetativas (assexuadas), embora a reprodução sexuada possa ocorrer em muitas espécies quando estão em condições apropriadas para a replicação celular (ANDRADE et al., 2014). As microalgas são organismos com exigência simples para o crescimento, mas uma mesma espécie de microalga pode apresentar perfil de crescimento distinto, de acordo com as condições de cultivo empregadas (SILVA, 2014).

O crescimento das microalgas pode variar com os nutrientes do meio de cultivo, as condições de temperatura e luminosidade. Em cultivos industriais de microalgas, a luminosidade pode ser o principal fator limitante para o aumento de escala. Como o crescimento fotoautotrófico e a produtividade de biomassa são altamente dependentes de luz, as melhores

áreas geográficas para cultivos de microalgas são aquelas com alta radiação solar durante o ano inteiro (JOHN et al., 2011).

A fonte de energia de base para as microalgas fotoautotróficas é a solar, sendo este um dos principais parâmetros que afetam o sucesso ou fracasso de culturas das microalgas. Com o aumento da intensidade de luz, aumenta a fotossíntese até que a taxa máxima de crescimento é atingida (ponto de saturação) (RICHMOND, 2000).

O pH, também é um dos parâmetros que influencia o crescimento das microalgas, pois afeta diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos presentes no meio. Assim, considera-se importante mantê-lo próximo à neutralidade para que os componentes do meio possam ser efetivamente absorvidos pelas microalgas (LOURENÇO, 2006; CORRÊA, 2015). O crescimento das microalgas envolve o consumo do CO<sub>2</sub> dissolvido no meio, acarretando a elevação do pH (>10). De maneira inversa, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> solubilizado no meio aquoso pode reduzir o pH (<5) e conseqüentemente inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (PIRES et al., 2012).

Outro parâmetro que afeta o crescimento é a temperatura, que se geralmente aumentada conduz a um aumento exponencial do crescimento das microalgas, até que um nível ótimo seja atingido, após o crescimento diminui. Para culturas ao ar livre e sistemas abertos, a capacidade de controlar as temperaturas é muitas vezes é limitado, e é determinado pela temperatura atmosférica, radiação solar, e umidade. A flutuação na temperatura ambiente pode resultar em temperaturas diurnas com diferenças de até 20 °C para as noturnas, o que pode afetar a produtividade (OLAIZOLA, 2000).

A temperatura ideal para os cultivos de microalgas, de modo geral, está entre 20 e 24°C, embora possa variar em função da espécie utilizada. Para algumas espécies a elevação da temperatura pode diminuir a quantidade de ácidos graxos insaturados e aumentar a quantidade de ácidos graxos saturados (RENAUD et al., 2004).

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes, com maior participação, em termos quantitativos, na matéria seca da alga (RICHMOND, 2004). O nitrogênio é o componente fundamental de três classes de substâncias estruturais e do metabolismo primário das células: proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteína e clorofila nas células. Já baixas concentrações diminuem o teor dessas duas substâncias, diminuindo drasticamente também a taxa de divisão celular (LOURENÇO, 2006).

A conversão de fósforo por microalgas ocorre por este elemento ser essencial para síntese celular de fosfolipídios, nucleotídeos e ácidos nucléicos. Tipicamente as células destes organismos contem aproximadamente 1% de fósforo em base seca, embora em certas condições, haja evidências que estes organismos sejam capazes de retirar das águas residuárias quantidades excedentes de fósforo para posterior utilização (VIEIRA et al., 2012). O fósforo e o nitrogênio são elementos chaves para o metabolismo das microalgas.

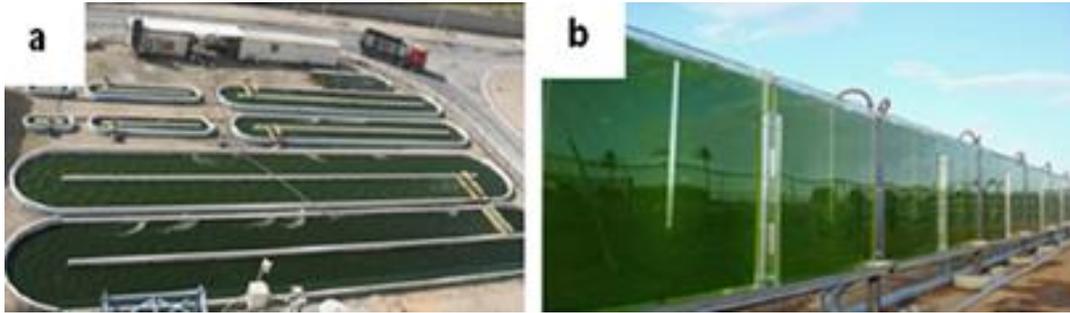
Em meio ao predomínio dessas matérias-primas, o setor de bioenergia vive uma expectativa pela consolidação das microalgas como fonte viável de biomassa para a produção de biocombustíveis. De acordo com Chisti (2007), estes micro-organismos fotossintetizantes são utilizados em aquicultura, para a produção de suplemento alimentar e para a extração de compostos de alto valor comercial, apresentando potencial para uso em biorremediação e biofertilização, assim como para a produção de vários tipos diferentes de biocombustíveis.

Segundo Rosenberg et al. (2008), as algas verdes ou clorofíceas são as mais promissoras para a produção de biodiesel, sendo os gêneros *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Dunaliella* os mais amplamente utilizados. Todavia, as espécies de *Scenedesmus* e *Chlorella* vem sendo apontadas nos últimos anos como as mais eficientes no processo de fixação de CO<sub>2</sub> acoplado ao tratamento de águas residuais e à síntese de lipídeos para a produção de biodiesel (XIN et al., 2010; BLERSCH et al., 2013).

### **2.3.2 Cultivo de microalgas**

Para que seja realizado o cultivo das microalgas, existem basicamente dois sistemas distintos para cultivo em escala industrial: Os tanques abertos (*raceway*) e os fotobiorreatores, fechados (Figura 1). Embora, cerca de 98% da produção de biomassa algácea comercial ocorra em tanques abertos (BENEMANN, 2008), os fotobiorreatores fechados são os mais viáveis para algumas microalgas que são facilmente contaminadas por microrganismos, pois eles apresentam maior eficiência, maior produtividade de biomassa, e podem ser utilizados para cultivar um maior número de microalgas do que em sistemas abertos (CHISTI, 2007).

Figura 1 - Sistemas de cultivo de microalgas: (a) lagoa raceway; (b) fotobiorreator de placas.



Fonte: Bitog et al. (2011).

O cultivo de microalgas em diferentes meios de cultura é uma ferramenta importantíssima na busca de certas composições químicas, permite estabelecer concentrações ideais de certos elementos. Entretanto, ainda não se sabe quais são as quantidades ideais de elementos essenciais (nutrientes) indispensáveis para cada espécie, isso porque as quantidades de nutrientes variam de uma espécie para outra de acordo com as suas exigências metabólicas. A deficiência de um nutriente essencial no meio pode inviabilizar o crescimento e o desenvolvimento da alga. Sendo assim os nutrientes são divididos em duas categorias micronutrientes e macronutrientes (LOURENÇO, 2006).

Os meios de cultura sintéticos utilizados no cultivo, à base de reagentes analíticos, apresentam elevado custo e sua composição elementar pode não estar adequada para cada espécie de alga. Para a escolha dos meios que são utilizados, é considerado as diferenças nutricionais, o efeito dos macronutrientes no crescimento e no conteúdo celular de microalgas. Alguns exemplos de meios são: BG11 e BBM (ANDERSEN et al., 2005), MC, MBM, MDM (WATANABE, 1960) e um meio com baixo teor de nitrogênio (ILLMAN et al., 2000). O meio BG11 apresenta uma alta concentração de N na forma de  $\text{NaNO}_3$ , e é referenciado adequado para produção de lipídeos (CHEN et al., 2011; FENG et al., 2011).

Nos últimos anos diversas pesquisas têm focado o cultivo de microalgas em efluentes, auxiliando no tratamento. Esgotos sanitários urbanos contêm em média  $50 \text{ g/m}^3$  de nitrogênio, sendo que cada  $\text{m}^3$  pode contribuir para a formação de 0,5 kg de biomassa para extração de biocombustível (PECCIA et al., 2013).

## 2.4 Biocombustíveis

Como as fontes de combustíveis não renováveis tendem a se esgotar, a busca por fontes energéticas renováveis foi impulsionada nas últimas décadas, surgindo assim, de maneira viável, os biocombustíveis líquidos de primeira, segunda e terceira geração (MAGRO et al., 2016).

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de açúcares, grãos e sementes, e requerem um processo simples de produção. A primeira geração mais conhecida de biocombustíveis é o etanol, que é extraído pela fermentação do açúcar de plantas cultivadas e amido contido em grãos de milho (AMORIM et al., 2011; CANAKCI; SANLI, 2008; MOSER; VAUGHN, 2012; SOUZA et al., 2014), e o biodiesel produzido a partir de plantas oleaginosas como a mamona e grãos de soja (ESCOBAR et al., 2009; DANTAS et al., 2011; SAVALIYA; DHORAJIYA; DHOLAKIYA, 2013).

Os biocombustíveis de segunda geração são produzidos pelo processamento da biomassa celulósica de plantas (SOCCOL, 2009; SAVALIYA; DHORAJIYA; DHOLAKIYA, 2013). Para a obtenção de biocombustíveis de primeira e segunda geração, há a necessidade de áreas agricultáveis para a obtenção da matéria prima, o que é um inconveniente, já que competem com a produção de alimento (GISELRØD; PATIL, 2008).

Os biocombustíveis de terceira geração são os obtidos através da biomassa de microrganismos, em especial de microalgas. Essa ideia surgiu na década de 50 e esforços foram concentrados com esse fim na década 70 (CHEN et al., 2009; VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011). As justificativas para a produção de biocombustíveis microalgais em comparação com os de primeira e segunda geração são que o cultivo pode ser realizado em terras com baixo potencial agrícola e, portanto, pode reduzir a competição por terras agricultáveis. Além disso, geram-se novas oportunidades econômicas para zonas árida, secas ou afetadas pela salinidade (SCHENK et al., 2008).

A partir da biomassa microalgal podem ser produzidos os dois tipos de biocombustíveis líquidos, o bioetanol através da hidrólise dos carboidratos da biomassa (MIRANDA; PASSARINHO; GOUVEIA, 2012) e o biodiesel através dos lipídios (CHISTI, 2008; GONG; JIANG, 2011).

*Chlorella vulgaris* tem sido amplamente utilizada em estudos fotossintéticos, em experiências de cultivo em massa e para a purificação de efluente de águas residuárias. Possui 51-58% de proteínas, 12-17% de carboidratos, 14-22% de lipídeos e 5% de minerais (BECKER,

1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal é a luz solar (VONSHAK, 1997).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo**

O experimento foi realizado na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) localizada na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

O município de Lavras está posicionado nas coordenadas geográficas 21° 13' 45" de latitude sul, 44° 58' 31" de longitude oeste e altitude média de 918 m. A região apresenta clima do tipo Cwa (mesotérmico ou tropical de altitude), com inverno seco e verão chuvoso, segundo a classificação de Köppen (SÁ JÚNIOR et al., 2012).

#### **3.2 Efluente**

O efluente utilizado no experimento foi proveniente da ETE-UFLA, projetada para o tratamento do efluente oriundo das instalações da própria universidade, tais como sanitários, restaurantes, lanchonetes e outros.

Atualmente, encontra-se implantado um sistema de tratamento de esgoto composto por gradeamento grosseiro, gradeamento fino, caixa separadora de gordura, estação elevatória, duas caixas distribuidoras de vazão, seis reatores anaeróbios de manta de lodo (UASB), seis filtros biológicos aerados submersos (FBAS), quatro filtros rápidos de areia descendentes (FRD), sistema de desinfecção por radiação ultravioleta, sistema de desinfecção por cloração, dois filtros prensa para lodo e sistema gerador de energia elétrica movido a biogás.

A coleta do efluente foi feita manualmente no reator UASB nº2 da ETE-UFLA (Figura 2), com o auxílio de um recipiente plástico de 20L.

Figura 2- Reator do tipo UASB de número 2.



Fonte: Da autora (2019).

### 3.3 Cultivos

Para a realização do cultivo de microalgas, foram coletados cerca de 40 L do efluente do reator UASB, foi adicionado em um reservatório de fibra de vidro, com capacidade para 100 L, coberto com tela, sob condições ambientes de temperatura e luminosidade (Figura 3). O tempo de batelada foi de 15 dias.

Figura 3- Reservatório de fibra de vidro.



Fonte: Da autora (2019).

Amostras do cultivo foram levadas para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária.

Utilizou-se uma estufa para a aclimação dos cultivos de modo a estabelecer um ambiente propício para a otimização do crescimento das microalgas, à temperatura de  $26^{\circ}\text{C} (\pm 2)$  (Figura 4). Foram dispostos na estufa, luzes fluorescentes com potência de 20w, com fotoperíodo controlado de 12 horas claro/ 12 horas escuro.

A contagem de células foi feita por câmera de Neubauer de 2 em 2 dias durante 15 dias.

No tanque da estação da ETE-UFLA, foram realizados dois cultivos, obtendo dois resultados. O primeiro cultivo foi realizado no mês de março do ano de 2019, onde as chuvas diminuem em quantidade e intensidade e a estação costuma ser a mais seca do ano.

O segundo cultivo foi feito no mês de abril do ano de 2019, no tanque da ETE-UFLA. A partir da cultura selecionada no tanque, realizou-se cultivos em laboratório, em duplicata, utilizando 10% do inóculo, 45% de meio de cultura BG-11 e 45% de efluente (cultivo 2). O cultivo controle (cultivo 2') também foi realizado, onde utilizou-se a mesma proporção de inóculo e 90% do meio de cultura BG-11. O cultivo em meio líquido obteve sucesso, visto que foi feito o isolamento, usando ágar, e não obteve crescimento de nenhum microrganismo na placa, porém sem sucesso. O cultivo feito em laboratório não apresentou crescimento, porque

o armário de aclimação passou por alguns desvios, não apresentou crescimento de células, como mostram as Figuras 7 e 8.

Posteriormente foram realizados três cultivos em laboratório, em duplicata, utilizando 10% do inoculo, 45% de meio de cultura BG-11 e 45% de efluente. Também foi feito o cultivo controle em duplicata, onde utilizamos 10% do inoculo e 90% do meio de cultura BG-11.

Realizou-se contagens diárias em câmara de Neubauer, de ambos, durante 10 dias. No meio de cultura BG-11, foi acrescentado o ágar, na tentativa de isolar microalgas do efluente.

O meio de cultura BG-11, usado tanto para manutenção e propagação dos inóculos quanto nos cultivos do planejamento experimental, apresenta a seguinte composição (RIPPKA et al., 1979): Macronutrientes-25g 500 mL<sup>-1</sup> de NaNO<sub>3</sub>, 0,4 g 10 mL<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g 10 mL<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g 10 mL<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,75 g 10 mL<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0,06 g 10 mL<sup>-1</sup> de Citrato de Ferro e Amônio, 0,06 g 10 mL<sup>-1</sup> de Ácido Cítrico, 0,01 g 10 mL<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>EDTA. Micronutrientes- 0,61 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,69g de MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 2,87 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,025 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,125 g de Mo<sub>7</sub>O<sub>2</sub>. Foi usado 10g de glicose em 1 L de meio de cultura, sendo 7,4 o valor do pH.

Figura 4- Estufa utilizada para desenvolvimento dos cultivos.



Fonte: Da autora (2019).

A partir dos dados obtidos, foram construídos gráficos para representar o crescimento de microalgas ao longo do tempo.

### 3.4 Clorofila

A quantificação da clorofila foi feita pela espectrofotometria (NUSCH, 1980). As amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,47 mm de diâmetro, os filtros foram dobrados ao meio e envolvidos em um lenço de papel para a retirada do excesso de água. O reagente usado foi o etanol 90% e HCl 0,1N (0,1M). Utilizou-se o banho maria, centrífuga e espectrofotômetro. Os filtros quando colocados no tudo de ensaio, foram cobertos com 6 mL de etanol.

Após a extração, os tubos foram envolvidos com papel alumínio e mantidos em geladeira (4°C) durante a noite. A centrifugação foi feita por 10 min a 3.500 rpm. Para a leitura de absorção, o branco foi feito com etanol 90%. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas a 665 nm. A leitura feita a 750 nm é para a correção de turbidez. Após as duas primeiras leituras (665 nm e 750 nm) as amostras foram acidificadas e lidas novamente a 665 nm e 750 nm. Para a realização dos cálculos de concentração foram usadas as seguintes fórmulas;

#### **Sem acidificação**

$$\text{Clorofila } (\mu\text{g/L}) = (12,2 \times (A_{665} - A_{750}) \times v) / (V \cdot L)$$

Onde:

A<sub>665</sub>= absorbância a 665 nm;

A<sub>750</sub>= absorbância a 750;

v= volume de etanol usado para extração;

V= volume de água filtrado em L;

L= largura da cubeta em cm.

#### **Com acidificação**

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/L}) = (29,5 \times (A_{665} - A_{665ac}) \times v) / (V \cdot L)$$

Onde:

A<sub>665</sub>= absorbância a 665nm antes da acidificação – absorbância a 750 nm antes da acidificação;

$A_{665ac}$  = absorvância a 665nm após a acidificação – absorvância a 750 nm após a acidificação;

$v$  = volume de etanol usado pra extração;

$V$  = volume de água filtrado em L;

$L$  = largura da cubeta em cm.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento em tanque de cultivo instalado na ETE-UFLA

O crescimento das microalgas está indicado nas Figuras 5 e 6, por meio da concentração de células em função do tempo de cultivo, presentes no efluente do tanque da ETE-UFLA.

Segundo Lourenço (2006), durante a fase de crescimento do cultivo, o aumento na concentração de células caracteriza um crescimento exponencial. Na representação em LOG pode se observar as fases do crescimento, sendo os três primeiros dias a fase em que as microalgas estão se adaptando ao meio de cultivo, a fase do crescimento exponencial está entre os dias quatro e cinco, e a fase final onde há o decréscimo exponencial no número de células.

Nos dois ensaios foram utilizados efluentes como meio nutritivo na figura 10, é aparente que se teve um sucesso no crescimento de microalgas, sendo assim, o meio de cultura utilizado favorece o desenvolvimento celular.

A densidade celular máxima é de  $4,9 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , mostrando microrganismos diversos e células típicas de *Chlorella*. O fato pode ser comprovado por Lúcio (2014) que realizou estudos com microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em efluente doméstico como meio de cultura alternativo e obteve uma densidade celular máxima de  $5,2 \times 10^7$  célula  $\text{mL}^{-1}$ .

Segundo Torres (2014) *Chlorella* demonstrou a melhor adaptação de crescimento em Efluentes de UASB multiplicou-se rapidamente sem interferências ou possíveis limitações presentes no efluente de UASB, tais como, competitividade por nutrientes e predadores. Foram dez dias de cultivo, sob condições laboratoriais e sobrevivência maior que 90%. A microalga *Chlorella* sobrevive e cresce no cultivo em efluente de UASB, isso indica uma alta adaptação.

Cho et al. (2011) afirmam que efluente de ETE pode ser utilizado para produção de biomassa microalgácea com menor custo, pois evita a necessidade de adição de nutrientes.

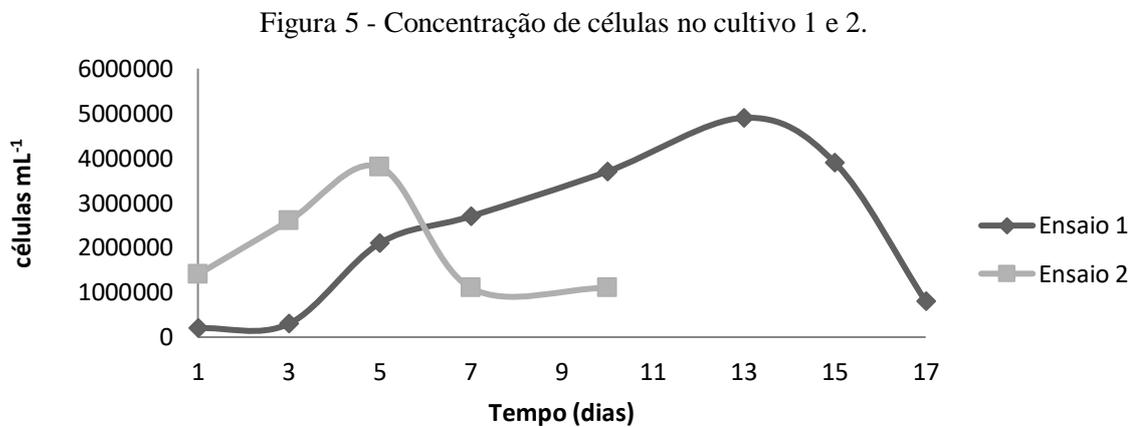
De acordo com Lopes et al. (2015) o cultivo suplementado com 50% de efluente do reator UASB, representa a concentração de efluente que proporcionou a maior velocidade de crescimento da *Chlorella sp.* O cultivo foi iniciado com uma concentração celular de  $1,26 \times 10^6$  cel. $\text{mL}^{-1}$  e finalizou com  $5,53 \times 10^7$  célula  $\text{mL}^{-1}$ . Os resultados foram relacionados com o encontrado no presente trabalho, proporcionando resultados satisfatórios, e possibilitando o desenvolvimento das microalgas.

Em vários estudos a *Chlorella* se destaca, pois apresenta um crescimento satisfatório no efluente, em relação aos diferentes meios de cultura. O efluente doméstico pode ser uma boa

alternativa para a produção de *Chlorella*, pois ela se adapta e pode apresentar ganho de biomassa maior que no meio sintético.

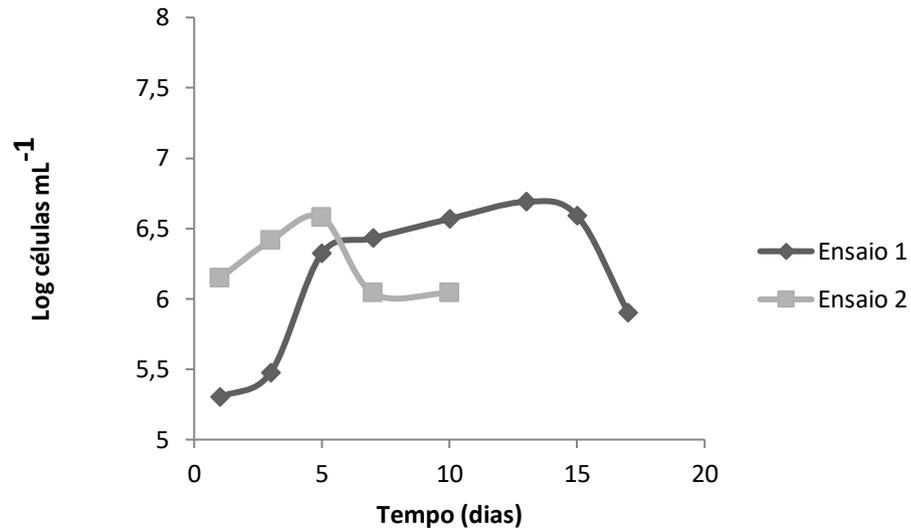
De acordo com Cunha et al. (2014) o cultivo da *Chlorella*, em meio BBM, com adição de 60% de efluente, apresentou no quinto dia uma densidade populacional de  $2,43 \times 10^7$  célula  $\text{mL}^{-1}$ .

O cultivo realizado no tanque da ETE-UFLA foi exposto a condições ambientais, ou seja, sem controle de temperatura e luminosidade. A temperatura é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos. Segundo Lourenço (2006) para o cultivo de microalgas de espécies tropicais, a temperatura deve permanecer em torno de 20 a 30°C. Durante o período que foram realizados os experimentos, observou-se uma relação direta entre a temperatura do ambiente. As microalgas são fotossintéticas e precisam do sol para a realização dessa fotossíntese. Com esses dados, podemos observar que o primeiro cultivo foi com números satisfatórios, podendo levar em consideração o período do ano em que foi realizada a coleta e feito o cultivo. Porque é uma estação do ano que a incidência solar é alta e as chuvas são poucas.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 6 - Concentração de células em LOG no cultivo 1 e 2.

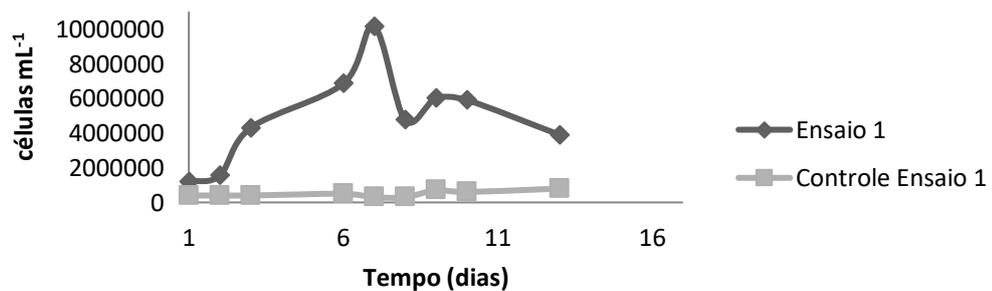


Fonte: Da autora (2019).

#### 4.2 Cultivo em laboratório com fotoperíodo

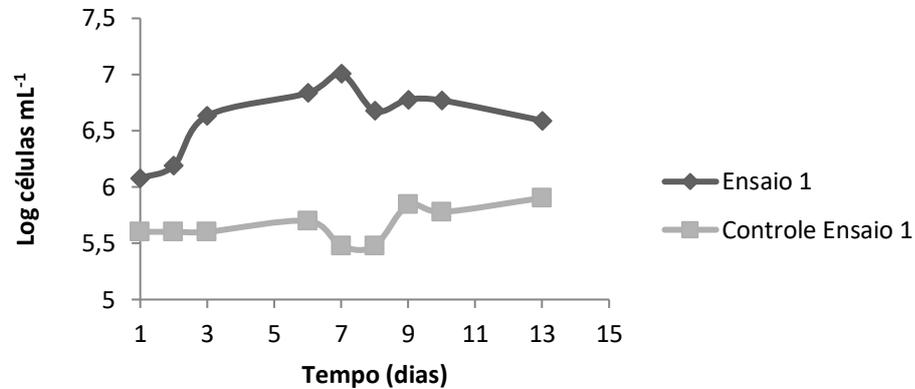
Foi observado o desenvolvimento de algas em todos os meios de culturas testados, no primeiro cultivo, isto se apresenta como um importante objetivo do projeto alcançado, desta forma pode-se afirmar que é possível a produção de biomassa com espécies de algas de efluentes em laboratório.

Figura 7 - Concentração de células no cultivo 1 e 2.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 8 - Concentração de células em LOG no cultivo 1 e 2.



Fonte: Da autora (2019).

*Chlorella vulgaris* no efluente doméstico como meio alternativo mostra uma densidade celular ligeiramente maior no efluente do que no meio sintético, devido a maior disponibilidade de nutrientes (SUALLI, 2012). O ensaio 1 obteve uma densidade máxima celular de  $6,57 \times 10^6$  célula mL<sup>-1</sup>.

Corroborando com o presente trabalho, Cho et al. (2011) observaram o crescimento gradativo de *Chorella sp.* cultivada em efluente de tratamento de esgoto sanitário com diferentes tipos de pré-tratamentos, e concluiu que o efluente apresenta componentes necessários disponíveis para o crescimento de microalgas, sem adição externa de nutrientes.

No entanto, Trevisan et al. (2014) observaram que a cinética de crescimento da *Chorella vulgaris* na produção do biodiesel empregando o efluente *in natura* não apresentou melhorias na concentração inicial de efluente, já que o volume de algas revelou alcançado, demandou tratamento para a remoção do material suspenso e microrganismos.

O terceiro cultivo foi feito no mês de maio do ano de 2019, foi um período que teve um índice alto de chuvas, o cultivo no tanque da ETE-UFLA não apresentou resultados. E assim, o cultivo em laboratório não foi realizado. No mês de março quando realizado o primeiro cultivo, o tanque da ETE-UFLA estava em um local de alto índice de sol. Ao passar dos meses, o sol já não pegava tanto no tanque. O tanque foi trocado de lugar, e mesmo assim o cultivo não apresentou resultados de crescimento.

Diversos fatores influenciam o crescimento de microalgas: fatores abióticos, como intensidade e qualidade luminosa, temperatura, concentração de nutrientes, de O<sub>2</sub> e de CO<sub>2</sub>,

potencial hidrogeniônico (pH), salinidade e presença de produtos químicos tóxicos; fatores bióticos, como patógenos (bactérias, fungos, vírus) e competição de outras espécies de microalgas; fatores operacionais, como cisalhamento produzido pela agitação, taxa de diluição e frequência de recuperação da biomassa (em cultivos contínuos), profundidade do leito e adição de bicarbonato (MATA et al., 2010).

As atividades metabólicas das microalgas podem ser largamente interferidas por circunstâncias químicas e físicas do ambiente. Existem diversos aspectos que podem restringir o desenvolvimento algal em laboratório, especialmente luz e temperatura. Os atributos mais relevantes da luz para as algas são a intensidade luminosa e a qualidade do espectro luminoso. A temperatura é relevante elemento regular dos índices de reações químicas dos processos biológicos, como a fotossíntese e a respiração, por exemplo (WOJCIECHOWSKI, 2013).

As técnicas de cultivo de microalgas mais usadas tem sido as lagoas aeradas abertas e os fotobiorreatores fechados (CHEN et al., 2011), sendo que o emprego das duas técnicas considera as propriedades do local de cultivo, a espécie utilizada, o volume de luz necessário e o processo de recuperação da biomassa do meio de cultura (centrifugação, floculação e filtração) que se deseja usar.

A análise de clorofila foi feita após 15 dias do início do cultivo no tanque da ETE-UFLA. A contagem foi realizada no dia 07 de maio de 2019. Foram feitas duas amostras, a primeira em 665 nm e a segunda a 750 nm, os valores da concentração de clorofila encontrados foram de  $0,1423 \text{ ugL}^{-1}$  e  $0,0671 \text{ ugL}^{-1}$ . Valores esses sem a adificação. Posteriormente foi feita a concentração com acidificação da amostra, foram duas amostras em 665nm, sendo as concentrações de clorofila  $0,0197 \text{ ugL}^{-1}$  e  $0,2557 \text{ ugL}^{-1}$ , e duas amostras de 750nm com concentrações de clorofila  $0,2655 \text{ ugL}^{-1}$  e  $0,2753 \text{ ugL}^{-1}$ .

No estudo de Marino (2017) em que o autor buscou investigar a correlação entre a clorofila *a* e cianobactérias, o autor comprovou que em 734 amostras, 250 apresentaram valor zero de concentração de clorofila *a*, 460 apresentaram valores entre 0,1 a  $10 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ , 18 de 10,1 a  $30 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$  e 6 de 30,1 a  $60 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$ .

Apesar de que nesse estudo não foi especificada o tipo de clorofila avaliada, percebe-se que os valores de concentração encontrados foram semelhantes em algum momento aos valores do estudo de Marino (2017) e estavam dentro dos valores permitidos pelo Conama (2005) para a presença dessa substância nas águas de diferentes classes.

A utilização da biomassa microalgácea para produção de biocombustíveis também requer investigações.

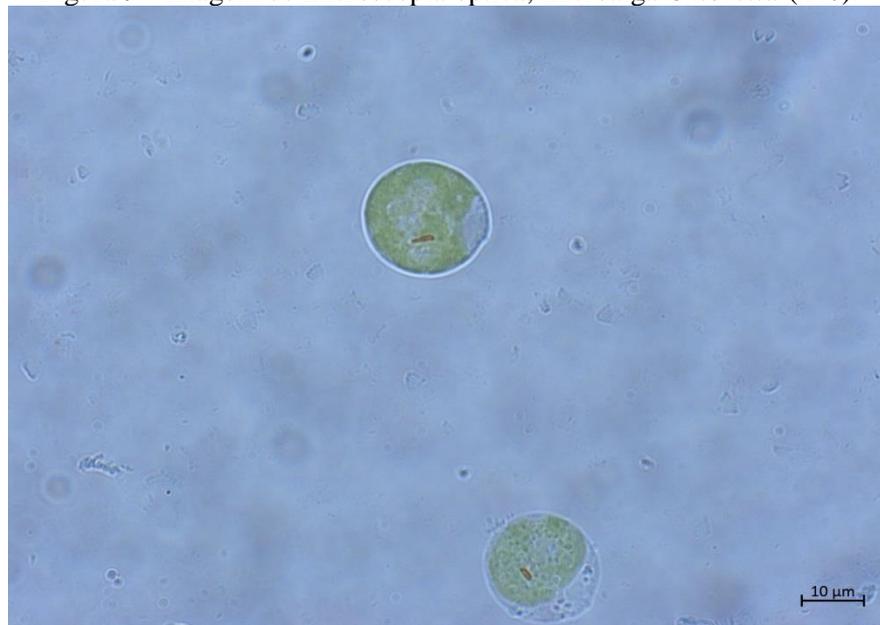
Cardoso, Vieira e Marques (2011) destacaram que a biotecnologia das microalgas vem sendo empregada em distintos produtos comerciais. Quanto aos biocombustíveis, algumas microalgas, devido ao volume de lipídios podem ser transesterificados em biodiesel. A biomassa residual alcançada depois que os lipídios são extraídos deriva distintos tipos de biocombustíveis como metano, bio-óleo e etanol. Além disso, conforme as condições do cultivo, obtém-se o hidrogênio que direciona sua produção pelas células, o metano, o bio-óleo e etanol que podem ser obtidos por meio da utilização das células intactas.

Os combustíveis derivados da biomassa têm relevante papel no cenário econômico, especialmente o biodiesel, visto que se trata de um dos combustíveis renováveis mais promissores, podendo ser utilizado puro ou em misturas com o diesel, além de ser menos poluente (FRANCO et al., 2013).

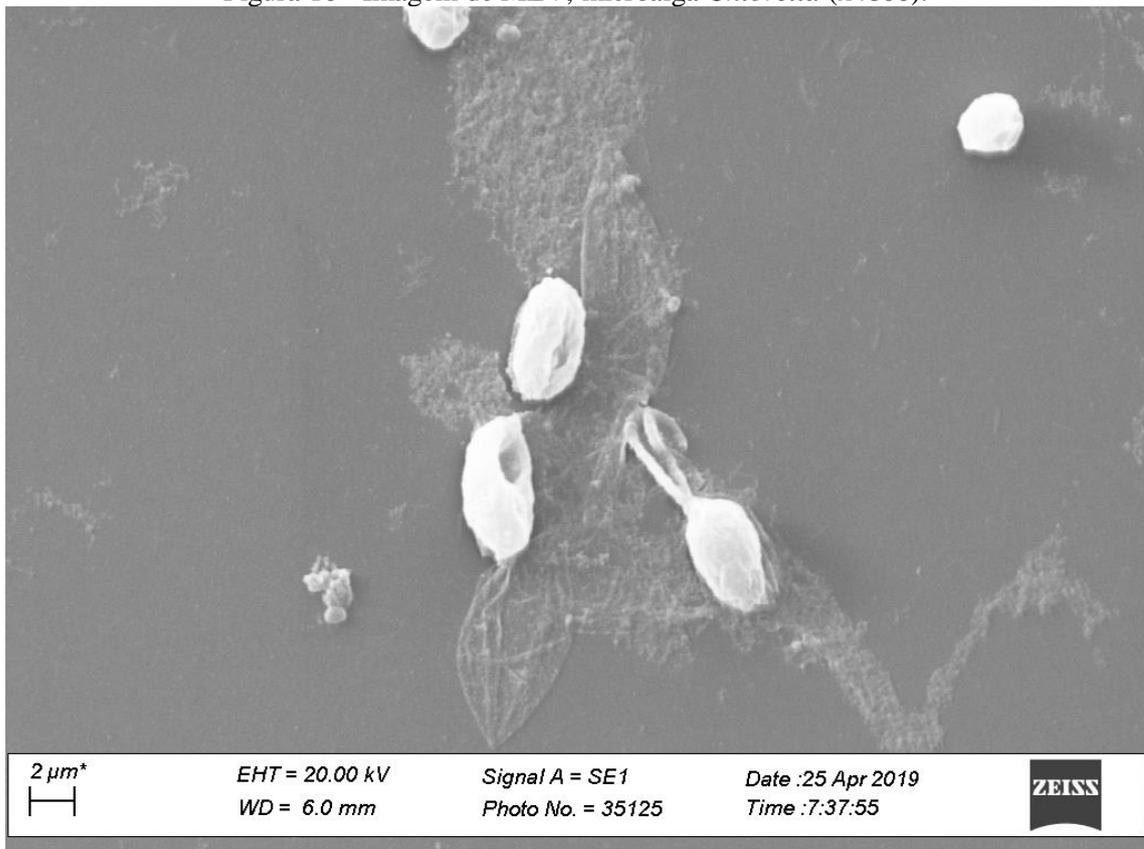
Principalmente como forma de incrementar a geração de energia dentro de Estações de Tratamento de Esgoto. Questões como toxicidade, rentabilidade, viabilidade econômica e praticidade do sistema também necessitam de investigações nas etapas seguintes de um projeto mais amplo.

As Figuras 9 e 10, são imagens de microscopia óptica e de varredura, da microalga *Chlorella*, identificada no cultivo.

Figura 9 - Imagem de microscopia óptica, microalga *Chlorella* (x40).



Fonte: Da autora (2019).

Figura 10 - Imagem de MEV, microalga *Chlorella* (x4800).

Fonte: Da autora (2019).

## 5 CONCLUSÃO

O cultivo de microalgas em efluentes de tratamento de esgoto contribui para a formação de biomassa, pois os nutrientes que estão presentes vão contribuir para o crescimento, suprimindo suas necessidades, assim como, Nitrogênio e Fósforo e outros macronutrientes e micronutrientes.

Através dos resultados obtidos durante o estudo, constata-se que a microalga *Chlorella* apresenta um ótimo crescimento celular quando utilizado o efluente como fonte de nutrientes.

São vários os meios de se obter nutrientes para as microalgas. Porém depende da quantidade que cada microalga precisa para se obter sucesso no cultivo.

O cultivo de microalgas em águas residuárias, é uma forma compensatória para reduzir a eutrofização causada pelos macronutrientes. Porém são muitos os estudos que precisam ser realizados, para a obtenção de fontes para produção de biocombustíveis.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. M. Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. **Journal of Phycology**, Hoboken, v. 4, n.1, p. 1-4, 1968
- AMORIM, H. V. et. al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. 1 ed. Seattle: Ed. Elsevier Academic Press, 2005.
- ANDRADE, S. D.; COLOZZI FILHO, A. (Ed.). **Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo**. v. 1, Londrina: Ed. IAPAR, 2014.
- AZEVEDO, S.M.F. O. e A.; BRANDÃO, C.C.S. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 2003, 56p.
- BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. New York: Ed. Cambridge University Press, 1994.
- BENEMANN J. R. **Opportunities and challenges in algae biofuels production**. Position Paper. by Dr. John R. Benemann in line with Algae World, 2008.
- BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. São Paulo: Ed. Rima. 2005.
- BLERSCH, D.M.; KANGAS, P.C.; MULBRY, W.W. Turbulance and nutrient interactions that control benthic algal production in an engineered cultivation raceway. **Algal Research**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 107-112, 2013.
- BRANCO, S. M. **Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária**. 3. ed. São Paulo: Ed. CETESB/ASCETESB, 1986.
- CARDOSO, A. S.; VIEIRA, G. E. G.; MARQUES, A. K. O uso de microalgas para a obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 542-549, 2011.
- CHEN, C.Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n.1, p. 71-81, 2011.
- CHERNICHARO, C. A. L. et. al. **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ed. PROSAB/FINEP, 1999.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHO, S. et al. Reuse of effluent water from municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, Oxford, v.102, n.18, p.8639-8645.

CORRÊA, D. O. **Desenvolvimento e caracterização do cultivo de microalgas em fotobiorreator alimentado por emissões gasosas de motores**. 2015. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CUNHA, T. H. C. da S. **Avaliação do crescimento de microalgas para produção de biocombustível utilizando efluente industriais e doméstico**. 2014. 59p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. **Florações de algas e de cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**. São Carlos: Ed. LDiBE, 2010.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n.1, p.101-105, 2011.

FERNÁNDEZ, A. F. G.; FERNÁNDEZ S. J. M.; MOLINAG. E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 12, n. 2, p. 131-15, 2013.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v.23, n.7, p.471-499, 2005.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

JOHN, R. P. et. al. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n.1, p. 186-193, 2011.

KOLLER, M. et al. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 37, n. 0, p. 377-388, 12// 2012. ISSN 0959-6526.  
LETTINGA, G. et. al. Use of the Upflow Sludge Blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 22, n. 4, p. 699-734, 1980.

LOPES, T. S. de A. et al. Estudo do potencial de geração de biocombustíveis líquidos a partir de microalgas: Utilização de efluentes agroindustriais e domésticos no desenvolvimento da *Chlorella* sp. **Revista Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, v. 18, n. 33, p. 25-36, 2015.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: Ed. Rima, 2006. 588 p.

LUCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella Vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. 2014. 71p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MARINO, L. Relação entre clorofila-a e cianobactérias no estado de São Paulo. **Revista DAE**, São Paulo, n. 1670, p. 32-43, 2017.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n.6, p. 841-846, 2006.

MIRANDA, J. R.; PASSARINHO, P. C.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 96, n. 2, p. 555-564, 2012.

MOHAMED, M. S. et al. Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 88, p. 30-41, 2014.

MULITERNO, A. et. al. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

MUTANDA, T. et. al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 57-70, 2011.

NAGLE, N.; LEMKE, P. Production of methyl-ester fuel from microalgae. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.24, n.5, p.355-61, 1990.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **ARCH HYDROBIOL. BEIH. ERGEBN. LIMNOL**, v. 14, p. 14-36, 1980.

OSWALD, W. J.; GOLUEKE, C. G. Biological transformations of solar energy. **Advanced Applied Microbiology**, San Diego, v. 2, p. 223-262, 1960.

PECCIA, J. et. al. Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. **Trends in Biotechnology**, London, v. 31, n. 3, p. 134-138, 2013.

PIMENTA, M. et. al. Desempenho de Reatores Piloto Tipo UASB e Híbrido para o Tratamento de Esgoto Doméstico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23.,2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABES, 2005.

PIRES, J. C. M. et al. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 3043-3053, 2012.

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

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus* sp in ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on the growth, total lipid content and fatty acid composition of recently isolated tropical microalgae *Isochrysis* sp., *Nitzschia closterium*, *Nitzschia paleacea*, and commercial species *Isochrysis* sp. (Clone T. ISO). **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 7, n. 6, p. 595-602, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. 1. ed. Oxford: Ed. Blackwell Science Ltd, 2004

ROSENBERG J. et. al. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 5, p. 430-436, 2008.

SAVALIYA, M. L.; DHORAJIYA, B. D.; DHOLAKIYA, B. Z. Recent advancement in production of liquid biofuels from renewable resources: a review. **Research on Chemical Intermediates**, Dordrecht, v.40, n. 2, p. 1439-1439, 2013.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA, S. Y. CO<sub>2</sub> fixation and oil production through microalga. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 729-31, 1995.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Review**. Oxford, v. 16, n. 6, p. 4316– 4342, 2012.

TORRES, H. S. de J. **Cultivo de microalgas em efluente de tratamento anaeróbico de esgoto**. 2014. 187 p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental)- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

TREVISAN, E. et al. Cultivo de microalga *Chorella vulgaris* em efluente doméstico para a produção de lipídeos. **Anais... XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, 19 a 22 de outubro de 2014.

TSUTIYA, M. T.; ALEM SOBRINHO, P. **Coleta e transporte de esgoto sanitário**. 1. ed. São Paulo: Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1999. 548 p.

VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbico de esgotos**. Um manual para países de clima quente. Campina Grande: Ed. Epgraf, 1994.

VIEIRA, J. G. et. al. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. **Desalination and Water Treatment**, Hopkinton, v. 40, n. 1-3, p. 224-230, 2012.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: Ed. DESA-UFMG, 2017.

VON SPERLING, M. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos** (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias) vol 1, Belo Horizonte: Ed. DESA-UFMG, 2005.

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

WATANABE, A. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. **Journal of General and Applied Microbiology**, Hoboken, v. 6, n. 4, p. 283-292, 1960.

XIN, L. et. al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, n. 14, p. 5494-5500, 2010.

YANG, J. et. al. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 159-165, 2011.

ZAMALLOA, C. et. al. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n. 2, p. 1149-1158.