



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA E RECURSOS  
PESQUEIROS**

**JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA**

**CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM EFLUENTES AQUÍCOLAS E  
SUA INFLUENCIA NA CONCENTRACAO LIPÍDICA**

**FORTALEZA  
2013**

**JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA**

**CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM EFLUENTES AQUÍCOLAS E  
SUA INFLUENCIA NA CONCENTRACAO LIPÍDICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de pesca e recursos pesqueiros.  
Área de concentração: Aquicultura

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

**FORTALEZA  
2013**

**JOSÉ WILLIAM ALVES DA SILVA**

**CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM EFLUENTES AQUÍCOLAS E  
SUA INFLUENCIA NA CONCENTRACAO LIPÍDICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de pesca e recursos pesqueiros. Área de concentração: Aquicultura

**APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**PROF. DR. WLADIMIR RONALD LOBO FARIAS (ORIENTADOR)**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC**

---

**PROF. DR. EMANUEL SOARES DOS SANTOS**  
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DO CEARÁ – IFCE**

---

**PROF. DR. GLACIO SOUZA ARAÚJO**  
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DO CEARÁ – IFCE**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

S58c Silva, José William Alves da.  
Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica / José William Alves da Silva.- 2013.  
47f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Aquicultura

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Biomassa. 2. Biorremediação. 3. Lipídio. 4. Produção. 5. Recuperação. I. Título.

---

CDD 639.2

Aos meus pais, meus ídolos, José “Zé Lins” da Silva Batista e Francisca Zulene Alves Leão, às minhas irmãs Juliana e Cristiane Alves, ao meu irmão Adriano Wagner, à minha noiva Naiane Mascena pelo amor, dedicação e confiança, pelo apoio e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

À UFC, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio, à sociedade pela confiança e investimentos nas pesquisas.

Ao meu orientador Wladimir Farias, pela transmissão de conhecimentos e práticas nesta área de estudo e pelas valiosas sugestões destinadas aos experimentos realizados no laboratório e, sobretudo, para esta dissertação..

Aos colegas do Grupo de Estudo e Pesquisa em Microalgas - GPEM Glácio Araujo, Alan Coêlho, Renato Teixeira, João Bezerra, Nara Nunes, Júnior Sousa, Huldson, Djavan, Zaine, Antonio “Tidy” Glaydson. Aos meus colegas da faculdade Rafael Barroso, Michael Akao, Thiago Fonseca, Fábio Martins, Nacélio “Cabrobó”, Fábio Pereira, Ícaro, Paula Naiane.

Aos funcionários do departamento de Engenharia de Pesca Klinger, Gonzaga, Edilson, Omar, Zacarias, Antonio, Afonso, Sideleyton. Aos professores do departamento Silvana, Alexandre, Moisés e Calíope, aos parceiros da engenharia química professor Fabiano e Leonardo.

Aos meus amigos Diego, Maxwell, Rafael, Halisson, Antonio Jr, Neto, André, Ricardo, Sandro, Carlos Eduardo, Hermano Farias e Igor pelas críticas, sugestões e, acima de tudo, pela amizade.

Todos os homens, por natureza, desejam saber.

*Aristóteles*

## RESUMO

As microalgas podem ser utilizadas como matéria prima para a produção de biocombustíveis em larga escala, em decorrência da facilidade de cultivo, acentuada velocidade de crescimento, alto teor de ácidos graxos e produtividade maior que outras oleaginosas, sendo uma excelente alternativa aos combustíveis fósseis. O experimento avaliou a utilização da microalga *Chlorella vulgaris* na fitorremediação de efluentes aquícolas e sua produção lipídica. Foram realizados três tratamentos, com seis repetições cada, utilizando como meios de cultura o Guillard f/2 e efluentes da carcinicultura e piscicultura. O cultivo estacionário foi realizado em um recipiente com volume útil de 12 L e foi acompanhado, diariamente, por espectrofotometria a 680 nm, sendo a determinação das concentrações de amônia, nitritos, nitratos e fosfatos realizada no início, meio e fim dos cultivos. A separação das células do meio de cultivo foi realizada por floculação química, usando NaOH 2N e, depois de lavada, a biomassa foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por 24 h. O tratamento com efluente da carcinicultura apresentou uma produção de biomassa significativamente maior que os demais, com valor médio de  $0,91 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ . Os compostos nitrogenados presentes nos efluentes atingiram remoção média de 76%, resultado considerado satisfatório. O cultivo realizado com efluente de piscicultura apresentou melhor produtividade lipídica com  $0,025 \pm 0,002 \text{ g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ . Assim, a microalga *C. vulgaris* pode ser utilizada na fitorremediação de efluentes aquícolas para a produção de biomassa e extração de lipídios.

Palavras-chave: Biomassa; Biorremediação; Lipídio; Produção; Recuperação.



## ABSTRACT

Microalgae can be used as feedstock for producing biofuels on a large scale, due to the ease of cultivation, strong growth rate, high content of fatty acids and higher productivity than other oils, making it an excellent alternative to fossil fuels. The study evaluated the use of microalgae *Chlorella vulgaris* in phytoremediation of aquaculture effluents and lipid evaluation. The microalgae was obtained in the algae bank Federal University of Ceará. Were three treatments with six replicates, using as culture medium Guillard f / 2 and effluents of shrimp and fish farming. Cultivation was batch containers of 12 L and was observed daily by spectrophotometry at 680 nm, and determining the concentration of ammonia, nitrite, nitrate and phosphorus performed at the beginning, middle and end of crops. The separation of the cells from culture medium was performed by chemical flocculation using NaOH 2N. After washing, the biomass was dried in an oven with renovation of air at 60 °C for 24 hours and then quantified. Treatment with effluent was, as biomass production, significantly higher than the others, showing an average weight of  $0.91 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$ . The effluent removed satisfactorily nitrogen compounds with a 76% removal of these compounds. The cultivation performed with tilapia effluent showed better lipid productivity with  $0.025 \pm 0.002 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ . The microalga *C. vulgaris* can be used for phytoremediation of aquaculture effluent, biomass and lipids.

Keywords: Biomass; Bioremediation; Lipid, Production, Recovery.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| FIGURAS  |   | PÁGINA |
|----------|---|--------|
| FIGURA 1 | <i>Chlorella vulgaris</i> (BEYERINCK, 1890).  | 18     |
| FIGURA 2 | Cultivo de <i>C. vulgaris</i> em recipientes de 12 litros.  | 20     |
| FIGURA 3 | Processo de floculação química de <i>C. vulgaris</i> pela adição de NaOH 2N no meio de cultivo.   | 23     |
| FIGURA 4 | Fluxograma do método Bligh; Dyer (1959).  | 24     |
| FIGURA 5 | Curvas de crescimento de <i>C. vulgaris</i> cultivadas com meio Guillard f/2 e efluentes de carcinicultura e piscicultura.  | 27     |
| FIGURA 6 | Curva de crescimento típica de uma população de microalgas expressa em densidade celular por dia de cultivo.  | 28     |
| FIGURA 7 | Taxas de crescimento diário de <i>C. vulgaris</i> cultivada com Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura.  | 30     |
| FIGURA 8 | Curvas de crescimento e remoção de nutrientes nos cultivos de <i>C. vulgaris</i> com Guillard f/2 (A), efluente de carcinicultura (B) e piscicultura (C). Letras diferentes mostram diferenças significativas na depleção de nutrientes durante o desenvolvimento das culturas. | 31     |
| FIGURA 9 | Célula da <i>C. vulgaris</i> sem membrana (A) e célula com membrana celular (B).  | 34     |

## LISTA DE TABELAS

| TABELAS  |   | PÁGINA |
|----------|---|--------|
| TABELA 1 | Composição do meio Guillard f/2.  | 19     |
| TABELA 2 | Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2.   | 19     |
| TABELA 3 | Composição dos efluentes da aquicultura.  | 20     |
| TABELA 4 | Coefficiente de determinação ( $R^2$ ) e equações de regressão linear entre $DO_{680nm}$ e PS da <i>Chlorella vulgaris</i> cultivada com Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura. | 26     |
| TABELA 5 | Parâmetros de rendimento cinético e lipídico dos cultivos de <i>Chlorella vulgaris</i> em Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura.  | 35     |
| TABELA 6 | Comparação de algumas fontes de biodiesel   | 36     |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |  |
|---------------------|--|
| DO <sub>680nm</sub> | Densidade óptica a 680 nanômetros              |
| K                   | Taxa de crescimento diário                     |
| PS                  | Peso seco                                      |
| AS                  | Alga seca                                      |
| RL                  | Rendimento lipídico                            |
| CEBIAQUA            | Centro de biotecnologia aplicada à aquicultura |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>20</b> |
| 2.1 <i>Chlorella vulgaris</i> e meios de cultivo .....                             | 20        |
| 2.2 Delineamento experimental .....  | 21        |
| 2.3 Parâmetros de rendimento cinético e lipídico .....                             | 22        |
| 2.4 Correlação entre densidade óptica (DO <sub>680nm</sub> ) e peso seco (PS)..... | 23        |
| 2.5 Separação da biomassa algal do meio de cultivo .....                           | 23        |
| 2.6 Extração e rendimento de lipídios .....  | 24        |
| 2.7 Análises estatísticas.....   | 26        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>  | <b>27</b> |
| 3.1 Correlação entre densidade óptica (DO <sub>680nm</sub> ) e peso seco (PS)..... | 27        |
| 3.2 Curvas de crescimento.....   | 27        |
| 3.3 Depleção de nutrientes durante os cultivos de <i>C. vulgaris</i> .....         | 31        |
| 3.4 Produção de biomassa e lipídios por <i>C. vulgaris</i> .....                   | 35        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>40</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A água é indispensável para a manutenção da vida e 70% do planeta é coberto por esta, destes 97,5% são oceanos e apenas 2,5% estão disponíveis para o consumo humano, no entanto a maior parte (2,2%) está indisponível em regiões de difícil acesso, como geleiras e aquíferos (MARENGO, 2008). Dessa forma, apenas 0,3% da água doce está disponível para utilização, sendo 70% deste volume destinado à agricultura, 22% à indústria e apenas 8% ao consumo humano (TUNDISI, 2002).

Este recurso possui múltiplos usos como o fornecimento urbano, geração de energia elétrica, recreação, navegação, aquicultura, pesca e paisagismo (MAIA, 2009). Devido a essa demanda, existe uma grande preocupação, em todo o mundo, com a redução anual do volume de água doce dos reservatórios (RIBEIRO; GALIZONI, 2003).

A produção aquícola mundial de crustáceos, moluscos e peixes tem de aumentar para satisfazer a demanda crescente (GJEDREM; ROBINSON; RYE, 2012) e também para compensar a redução de captura da pesca, pois algumas espécies já se encontram sobre exploradas (KALIKOSKI; SEIXAS; ALMUDI, 2009). Para aumentar a produção é necessário estimular o crescimento sustentável da aquicultura em grandes corpos hídricos, aumentando a área de produção em reservatórios onde já existem polos aquícolas e reaproveitando a água de cultivos em tanques e viveiros (KUBTIZA, 2011).

A aquicultura depende dos ecossistemas nos quais está inserida e é impossível cultivar organismos aquáticos sem provocar alterações ambientais, porém é possível reduzir significativamente o impacto sobre o meio ambiente (COELHO, 2012). Esta abordagem deve fazer parte do processo produtivo, uma vez que não podem ser desenvolvidas tecnologias visando aumentar apenas a produtividade dos cultivos sem avaliar os impactos ambientais produzidos (VALENTI, 2002).

A geração e descarga de elevadas quantidades de efluentes com alto potencial poluidor, compostos por restos de ração não consumida e excretas metabólicas, aumentaram paralelamente com o desenvolvimento da aquicultura mundial que, devido à demanda crescente, teve um rápido desenvolvimento nas últimas décadas, ocasionado um significativo aumento dos impactos negativos no ambiente (CRAB *et al.*, 2007). Em acordo com estas afirmações, Piedrahita (2003) e Sugiura *et al.* (2006) observaram que o processo de produção de organismos aquáticos gera quantidades significativas de efluentes contaminados e que, as descargas da aquicultura para os corpos hídricos levam nutrientes orgânicos e inorgânicos, como a amônia, fósforo, carbono orgânico e matéria orgânica.

A eutrofização das águas costeiras e continentais causada por atividades antrópicas tornou-se um problema comum em muitos países. Este processo contribui para um aumento na produtividade primária e frequentemente gera alterações indesejáveis na estrutura e na função dos ecossistemas aquáticos. Nas últimas décadas, a eutrofização causada pela aquicultura intensiva tornou-se uma preocupação constante para os produtores e agências de controle ambiental, devido à grande quantidade de resíduos produzidos por essa atividade (MARINHO-SORIANO *et al.* 2011), por isso é necessário o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo mais sustentáveis na aquicultura para diminuir os impactos negativos da atividade. Uma das alternativas é a fitorremediação que utiliza vegetais aquáticos para assimilar os nutrientes produzidos pelo cultivo de animais aquáticos.

Em viveiros de aquicultura, uma grande fração de nutrientes, disponíveis na ração, encontra-se no sedimento e nos efluentes ao final do cultivo e frações menores destes compostos fazem parte da composição corporal dos organismos cultivados (BOSCOLO *et al.*, 2008; GUIMARÃES, 2008). A maior fração dos nutrientes de entrada deve fazer parte do pescado, aumentando a produtividade e diminuindo a quantidade destes componentes nos corpos receptores, corroborando para o respeito social, econômico e sustentabilidade ambiental (BOSMA; VERDEGEM, 2011).

Uma das práticas mais comuns para o tratamento de efluentes aquícolas é o uso de bacia de sedimentação de sólidos suspensos, bem como a combinação de sistemas de remoção de sólidos e processo de nitrificação, mais conhecido como biofiltros, semelhantes às técnicas utilizadas em águas residuárias de origem doméstica (MICHAEL *et al.*, 2013).

Recentemente, novos sistemas de tratamento de efluentes da aquicultura estão sendo utilizados pelas fazendas de organismos aquáticos, como exemplo os *wetlands* que são tanques que trabalham com uma pequena lâmina de água para facilitar a sedimentação dos sólidos suspensos e a desinfecção por meio da ação ultravioleta da radiação solar, em conjunto com macrófitas aquáticas ou mangue para remoção dos nutrientes (FAULWETTER *et al.*, 2009).

Outro sistema também muito utilizado na última década é o bioflocos, o qual é baseado na formação de flocos microbianos constituídos de microalgas, excretas, exoesqueletos, restos de organismos, bactérias, protozoários, invertebrados, entre outros. Estes agregados auxiliam na assimilação dos compostos nitrogenados presentes na água de cultivo, possibilitando sua reutilização por diversos ciclos, enquanto os compostos orgânicos nitrogenados são convertidos em biomassa bacteriana (BALOI *et al.*, 2013). Para estimular a formação dos bioflocos o ambiente de cultivo deve ser fertilizado com fontes ricas em

carbono e ser fortemente oxigenado, favorecendo o crescimento bacteriano (CRAB, 2012). O bioflocos não é diretamente um sistema de tratamento de efluentes, mas por ser um método sem renovação e descarte de água, torna-se um grande aliado na conservação dos recursos hídricos.

A biorremediação de efluentes utilizando microalgas de alto valor comercial já vem sendo utilizada em escalas menores e sendo introduzido gradualmente em sistemas de cultivos mais complexos (CHUNTAPA; POWTONGSOOK; MENASVETA, 2003). Nedbal *et al.*, 2008, afirmam que cultivos de organismos aquáticos com altas taxas de alimentação geram elevadas cargas de nutrientes suficientes para manter o crescimento algal, que por sua vez, remove os nutrientes e captura o CO<sub>2</sub>.

A fitorremediação, como a implementação das microalgas no tratamento de efluentes, é utilizada para remoção de compostos nitrogenados e fósforo que podem causar eutrofização nos corpos hídricos receptores (RUIZ-MARTINEZ *et al.*, 2012). Além disso, são capazes também de remover metais pesados, incorporando-os na parede celular (RICHARDS; MULLINS, 2013) e alguns compostos orgânicos tóxicos como fenóis e clorofenóis (CHIAIESE *et al.*, 2011).

As microalgas são organismos unicelulares, filamentosos ou coloniais que podem apresentar estrutura celular procariótica ou eucariótica (BASHAN; BASHAN, 2010). Compõem o grupo das procarióticas as Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. Já as eucarióticas pertencem principalmente às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos), Cryptophyceae (criptomônadas), Prasinophyceae e Chlorophyceae (algas verdes) (BICUDO; MENEZES, 2006). Estes organismos são de extrema importância para a produtividade primária dos oceanos e recursos hídricos continentais, bem como na fixação do CO<sub>2</sub> (CHISTI, 2007) e produção de oxigênio (BERBEROGLU; GOMEZ; PILON, 2009).

As microalgas são bastante utilizadas na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da facilidade de cultivo, ao pequeno tamanho, acentuada velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados (DERNER *et al.*, 2006). Esses microorganismos também acumulam grandes quantidades de óleo, principalmente triglicerídios, que podem ser extraídos e convertidos por processos químicos em biodiesel (URI; TATYANA; MEIRA, 2010).

Atualmente, o foco para produção de biodiesel está caminhando para o uso de culturas não comestíveis como a reutilização do óleo de cozinha, aproveitamento de gordura animal de baixa qualidade e cultivo de microalgas (DEVAPPA *et al.*, 2010). Algumas



espécies de microalgas são fontes promissoras para produção de biodiesel em larga escala (CHISTI, 2008), com produtividades maiores que outras oleaginosas vegetais (GAO *et al.*, 2010), sendo uma solução viável do ponto de vista econômico, ambiental e uma excelente alternativa aos combustíveis fósseis (SYDNEY *et al.*, 2011, ZENG *et al.*, 2011). Além disso, sua produção não compete com o plantio de alimentos, pois as microalgas podem ser cultivadas em regiões não agricultáveis (SUBHADRA; EDWARDS, 2010).

A produção de microalgas em larga escala apresenta algumas dificuldades como, por exemplo, o uso de nutrientes inorgânicos, necessidade de um grande volume de água e a dificuldade de separação das células de menores tamanhos (0,5-30  $\mu\text{m}$ ) do meio de cultivo líquido (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Uma possível solução para superar o alto custo dos cultivos de microalgas é a substituição da água potável por água do mar ou por águas residuárias de origem rural, urbana e indústria, ou da aquicultura, ricas em nutrientes (CHO *et al.*, 2011), bem como utilizar gases de combustão de indústrias e termoeletricas como fonte de  $\text{CO}_2$  para acelerar a fotossíntese (MORAIS; COSTA, 2007).

A composição do meio de cultura é importante no cultivo de microalgas para a obtenção de uma alta concentração celular final. Além disso, os constituintes do meio devem satisfazer os requisitos básicos para produção e acúmulo de metabólitos celulares, proporcionando um adequado fornecimento de energia para a biossíntese e manutenção celular (AZMA *et al.*, 2011).

Alterações nas condições de cultivos de microalgas como temperatura (MEINERZ *et al.*, 2009), intensidade luminosa (GUEDES *et al.*, 2010) e composição dos nutrientes do meio (YANG *et al.*, 2011) podem favorecer o crescimento da biomassa e influenciar na produção de lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos e outros constituintes (RADMANN; COSTA, 2008). Existem vários meios de cultura, sendo alguns específicos para certos grupos e espécies de microalgas (VOLKMANN *et al.*, 2008). Assim, a preparação do meio de cultura vai depender do composto alvo a ser obtido, que também definirá a utilização de um método de extração específico, seja para proteínas, lipídios, carboidratos ou pigmentos (VALDUGA *et al.*, 2009; MULBRY *et al.*, 2009).

A densidade celular em uma cultura de microalgas tende a aumentar algum tempo após sua inoculação no meio de cultura, devido à assimilação dos nutrientes e adequadas condições físicas e químicas no cultivo (CHENG *et al.*, 2006). Assim, os nutrientes dissolvidos (N, P, Si, Fe, Co etc.) no meio são reduzidos com o incremento celular, diminuindo consideravelmente suas concentrações ao final do cultivo (JIANG *et al.*, 2011).

Diferentes meios de cultivo podem influenciar na recuperação de biomassa e na composição bioquímica das microalgas, alterando o teor de lipídios totais entre outros compostos (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). De acordo com Scott *et al.* (2010), é possível obter maior conteúdo lipídico e um elevado crescimento de *Chlorella vulgaris* com a redução natural do nitrogênio no meio, o que não ocorre quando a microalga é inoculada em um meio totalmente isento de nitrogênio. A depleção de nutrientes para o cultivo de *C. vulgaris* é uma excelente forma de incrementar sua recuperação de biomassa e aumentar a produção de lipídios. Essa estratégia pode ser utilizada em uma produção em larga escala, o que torna a espécie uma candidata bastante promissora para a produção de biodiesel (SILVA, 2011).

Dragone *et al.* (2011) verificaram um maior acúmulo de amido em *C. vulgaris* e Costa *et al.* (2006) também encontraram maior rendimento lipídico em *C. vulgaris* e *C. minutissima* quando reduziram a quantidade de nitrato nos meios de cultivo. Os compostos nitrogenados são os que apresentam as maiores concentrações nos efluentes aquícolas, semelhante aos meios de cultura definidos. Estes compostos são potencialmente tóxicos aos organismos aquáticos em quantidade elevadas (MIRANDA-FILHO *et al.*, 2009).

O potencial de aplicação da microalga *C. vulgaris* para a biorremediação de efluentes têxteis foi avaliado por Lim *et al.* (2010), eles utilizaram quatro tratamentos em tanques com grande quantidade de corante têxtil, a microalga foi capaz de remover a cor do efluente além de reduzir consideravelmente a amônia e fósforo. A mesma espécie foi utilizada por Kim *et al.* (2010), para avaliar a capacidade de remoção de nitrogênio na forma de íon amônia ou amônio, sendo capaz de remover drasticamente os compostos nitrogenados em apenas 48 h, evidenciando seu elevado potencial para tratamento de águas residuais.

Cho *et al.*, (2011) utilizaram efluentes pré-tratados por filtração e radiação ultravioleta para o cultivo *Chlorella* sp. visando a produção de biodiesel. Os autores encontraram uma elevada produtividade lipídica e evidenciaram altas taxas de remoção de nitrogênio e fósforo totais. Este estudo mostrou que os efluentes municipais podem ser usados para o cultivo em massa de microalgas.

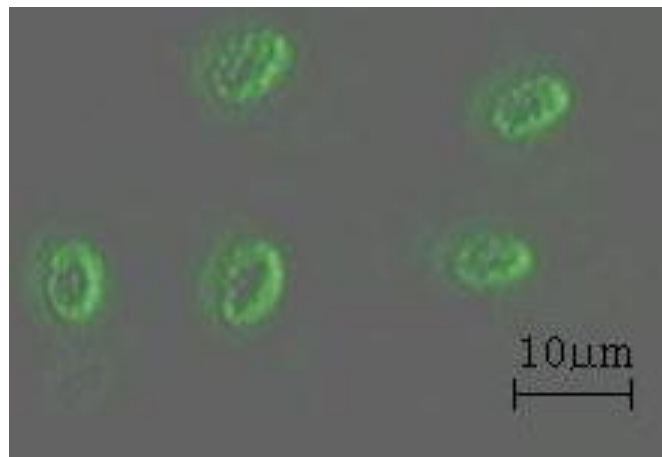
O cultivo misto de *C. vulgaris* com a cianofícea *Planktothrix isoethrix* é uma possível opção para remoção de nitrogênio e fósforo, além de controlar o pH e reduzir a emissão de amônia para a atmosfera (SILVA-BENAVIDES; TORZILLO, 2011).

A microalga *C. vulgaris* (BEYERINCK, 1890) (FIGURA 1) pertence à classe Trebouxiophyceae, ordem Chlorellales, família Chlorellaceae (GORS *et al.*, 2010). É uma espécie unicelular, cosmopolita e esférica, sem movimentos e com diâmetro variando de 2,0 a

10,0  $\mu\text{m}$  (PHUKAN *et al.*, 2011). Os potenciais usos desta microalga são decorrentes do seu alto valor nutricional, rápido crescimento, resistência às contaminações em cultivos maiores, bem como uma produção de biomassa constante e com ótima composição bioquímica (JANCZYK; FRANKE; SOUFFRANT, 2007).

Essa espécie é muito utilizada na indústria alimentícia (GOUVEIA *et al.*, 2007), tanto na alimentação humana (MORAIS; COSTA, 2008) como de organismos aquáticos (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2009), bem como na indústria farmacéutica (WANG *et al.*, 2010). Também é bastante usada no tratamento de efluentes (LIM; CHU; PHANG, 2010) e na produção de biocombustíveis (WIDJAJA; CHIEN; JU, 2009).

Figura 1- *Chlorella vulgaris* (BEYERINCK, 1890).



Fonte: Arquivo pessoal.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a microalga *Chlorella vulgaris* na fitorremediação de efluentes aquícolas e avaliar sua influência na produção de lipídios.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 *Chlorella vulgaris* e meios de cultivo

A microalga *C. vulgaris* foi obtida do cepário do Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde é mantida em meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975) com temperatura (21 °C) e fotoperíodo (16 h escuro e 08 h claro) controlado. Para a formulação de um litro do meio de cultura, foram utilizados os macronutrientes (1,0 mL) nitrato de sódio; fosfato de sódio e silicato de sódio, 1,0 mL de uma solução de metais traço (micronutrientes) e 0,5 mL de uma solução de vitaminas, composta por 100 mg de vitamina B1 (cloridrato de tiamina), 100 mg de vitamina B6 (cloridrato de piridoxina), 5000 mcg de vitamina B12 (cianocobalamina) e excipiente (dietanolamina) para completar o volume específico de 3 mL de cada ampola (TABELAS 1 e 2).

Tabela 1 - Composição do meio Guillard f/2.

| Solução | Componentes         | Solução estoque<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Quantidade no meio de<br>cultura (mL L <sup>-1</sup> ) |
|---------|---------------------|---|--|
| 1       | Nitrato de sódio    | 75                                      | 1,0  |
| 2       | Fosfato de sódio    | 5                                       | 1,0  |
| 3       | Silicato de sódio   | 30                                      | 1,0  |
| 4       | Solução de vitamina | *                                       | 0,5  |
| 5       | Metais traço        | **                                      | 1,0  |

\* 50 mL de água destilada mais duas ampolas da vitamina.

\*\* A formulação da solução de metais traço está representada na tabela 2.

Fonte: Guillard, 1975.

Tabela 2 - Composição da solução de metais traço do meio Guillard f/2.

| Componentes          | Solução estoque<br>(g L <sup>-1</sup> ) | Quantidade na solução de metais traço |
|----------------------|---|---------------------------------------|
| Cloreto de ferro     | -                                       | 3,15 g L <sup>-1</sup>                |
| Na <sub>2</sub> EDTA | -                                       | 4,36 g L <sup>-1</sup>                |
| Sulfato de cobre     | 9,8                                     | 1,0 mL L <sup>-1</sup>                |
| Molibdato de sódio   | 6,3                                     | 1,0 mL L <sup>-1</sup>                |
| Sulfato de zinco     | 22                                      | 1,0 mL L <sup>-1</sup>                |
| Cloreto de cobalto   | 10                                      | 1,0 mL L <sup>-1</sup>                |
| Cloreto de manganês  | 180                                     | 1,0 mL L <sup>-1</sup>                |

Fonte: Guillard, (1975).

Além do Guillard f/2 também foram utilizados como meios de cultivo dois tipos de efluentes, sendo um oriundo de uma carcinicultura e outro de uma piscicultura (TABELA

3). O primeiro foi coletado na drenagem de um viveiro no final da engorda dos camarões da fazenda Ceaqua, localizada no município de Beberibe – CE e foi transportado até o Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA) em recipientes de 50 L. O segundo foi obtido ao final da indução sexual realizada em um tanque da estação de piscicultura Dr. Raimundo Saraiva da Costa, localizada na Universidade Federal do Ceará, sendo também coletado em recipientes de 50 L e transportados até o CEBIAQUA. Ambos os efluentes, durante a coleta, foram filtrados em uma malha 25  $\mu\text{m}$  para retirada do plâncton e, posteriormente, autoclavados a 120 °C durante 15 minutos para eliminar bactérias e outros patógenos, que podem interferir no desenvolvimento algal.

Tabela 3 - Composição dos efluentes da aquicultura.

| Efluente       | Parâmetros                       |                                   |                                   |                                   | Salinidade |
|----------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|
|                | Amônia<br>( $\text{mg L}^{-1}$ ) | Nitrito<br>( $\text{mg L}^{-1}$ ) | Nitrato<br>( $\text{mg L}^{-1}$ ) | Fósforo<br>( $\text{mg L}^{-1}$ ) |            |
| Carcinicultura | 1,07                             | 0,009                             | 2,15                              | 0,118                             | 30         |
| Piscicultura   | 0,29                             | 0,005                             | 1,4                               | 0,075                             | 0          |

Fonte: Dados do experimento

## 2.2 Delineamento experimental

As microalgas foram cultivadas de forma estacionária (OHSE *et al.*, 2009) em seis repetições para cada meio de cultivo, utilizando recipientes com 12 L úteis (FIGURA 2).

Figura 2 - Cultivo de *C. vulgaris* em recipientes de 12 litros



Fonte: Arquivo pessoal.

Todo o material utilizado e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C para evitar qualquer tipo de contaminação. As condições de cultivo permaneceram constantes, com temperatura de  $28 \pm 1$  °C, luminosidade em torno de  $60 \mu\text{E cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  tendo como fonte duas lâmpadas fluorescentes de 40 W, e aeração fornecida por um soprador com um fluxo de  $3,0 \pm 1,0 \text{ L ar min}^{-1}$ .

Foram realizados três tratamentos variando os meios de cultura para a *C. vulgaris*, sendo o Guillard f/2 como controle e os dois tipos de efluente, da carcinicultura e piscicultura. Inicialmente, os inóculos foram aclimatados à cada meio de cultivo, utilizando erlemeyers com 9 L úteis sob as mesmas condições de temperatura, luminosidade e aeração durante três dias.

Em cada tratamento (meio de cultivo), as microalgas foram inoculadas em uma densidade óptica ( $\text{DO}_{680\text{nm}}$ ) inicial de  $0,100 \pm 0,023$  e, diariamente, determinou-se a  $\text{DO}_{680\text{nm}}$  para acompanhar o desenvolvimento das culturas, utilizando um espectrofotômetro HACH 2000.

As concentrações de N-amoniaco, N-nitrito, N-nitrato e fosfato foram determinadas nos meios de cultivo, na metade (terceiro dia após a inoculação da microalga) e fim (fase estacionária do cultivo) do experimento por espectrofotometria. Para isso, amostras de 100 mL, de cada repetição, foram retiradas e centrifugadas a  $3.000 \times g$  por 5 min. Em seguida, a cada 25 mL das amostras foi adicionado os reagentes NitriVer 3 Nitrite, NitraVer 5 Nitrate, PhosVer 3 Phosphate para as determinações das concentrações de nitrito, nitrato e fosfato, respectivamente. O método de Nessler foi utilizado para determinação da amônia, sendo utilizados 1,0 mL do reagente de Nessler, 3 gotas de estabilizante mineral e 3 gotas de álcool polivinílico. Após o tempo de reação, as amostras foram levadas ao espectrofotômetro e a concentração dos compostos foi expressa em  $\text{mg L}^{-1}$ .

### 2.3 Parâmetros de rendimento cinético e lipídico

Com a obtenção dos dados de biomassa seca, calculou-se a taxa de crescimento em divisões por dia (K) até o dia de maior produtividade das culturas (OHSE *et al.*, 2008). Esse parâmetro foi obtido de acordo com a equação 1, descrita por Lourenço (2006):

$$K = \log_2 \left( \frac{N_f/N_0}{D_t} \right) \quad (1)$$

Onde:

$K$  – taxa de crescimento em duplicação por dia (divisões dia<sup>-1</sup>),

$N_0$  e  $N_f$  – Biomassa seca no início e no dia em que o cultivo obteve a máxima concentração celular, respectivamente,

$D_t$  - tempo de cultivo em dias.

#### 2.4 Correlação entre densidade óptica (DO<sub>680nm</sub>) e peso seco (PS)

Ao final do experimento, foram coletadas amostras das seis repetições de cada tratamento e diluídas. Posteriormente, 100 mL de cada diluição foram centrifugados a 3000 x g durante 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi drenado e a biomassa foi secada em estufa com renovação de ar a 60 °C durante 24 h.

De acordo com a equação 2 descrita por Sipaúba-Tavares; Rocha (2003), estabeleceu-se a correlação linear entre DO<sub>680nm</sub> e o peso seco (PS) das culturas. A partir da correlação entre essas duas variáveis, foi determinada as respectivas equações de regressão linear (LIU; WANG; ZHOU, 2008).

$$v = V - \left[ \left( \frac{D_f}{D_i} \right) V \right] \quad (2)$$

Onde:

$v$  – Volume renovado em mL,

$V$  – Volume do recipiente em mL,

$D_f$  – Densidade celular desejada em cels mL<sup>-1</sup>,

$D_i$  – Densidade celular atual em cels mL<sup>-1</sup>.

#### 2.5 Separação da biomassa algal do meio de cultivo

A separação da biomassa de *C. vulgaris* do meio de cultivo foi realizada na fase estacionária das culturas para melhor avaliar a máxima remoção dos compostos nitrogenados e fosfatados durante os cultivos (SEBASTIEN; GRANJA, 2006). Para essa separação, as culturas foram submetidas a uma floculação química (FIGURA 3) induzida pelo aumento do

pH do meio (CHEN *et al.*, 2011a), utilizando uma solução de hidróxido de sódio 2 N (NaOH) (SILVA *et al.*, 2010).

Após a completa floculação e sedimentação, o sobrenadante foi descartado e os flocos foram lavados com água destilada para retirada do agente floculante e vestígios do meio de cultivo. Posteriormente, a biomassa recuperada da microalga foi seca em estufa com renovação de ar a 60 °C por 24 h e pesada em balança analítica.

Figura 3 - Processo de floculação química de *C. vulgaris* pela adição de NaOH 2 N no meio de cultivo.



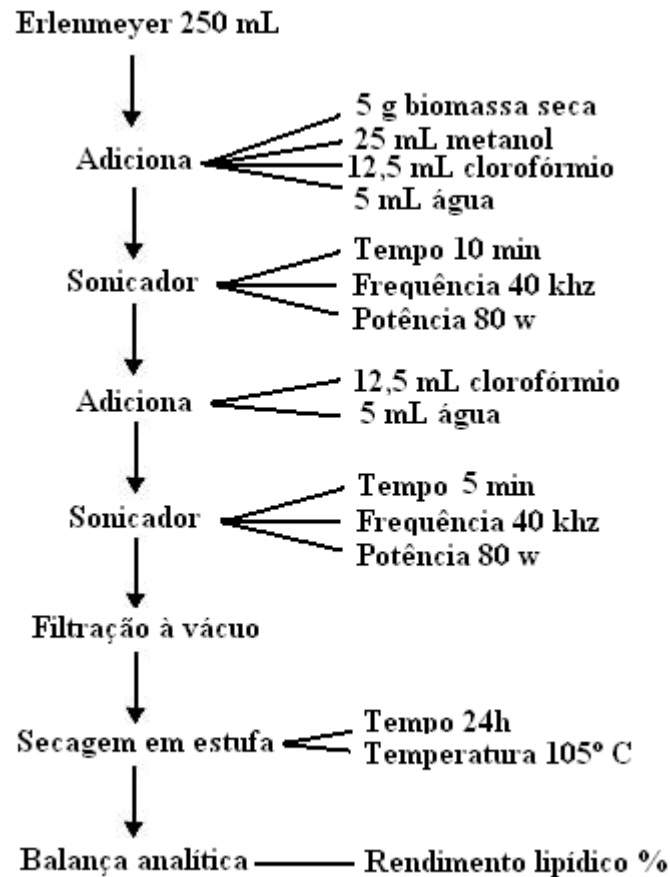
Fonte: Arquivo pessoal

## 2.6 Extração e rendimento de lipídios

O método de Bligh; Dyer (1959) foi utilizado para extração lipídica. Foram adicionados a 5 g de biomassa seca da microalga, em triplicata, em um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de metanol, 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O erlenmeyer foi tampado e levado para sonicar, em banho ultrasônico com frequência de 40 kHz e potência de 80 W durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados mais 12,5 mL de clorofórmio e 5 mL de água e realizada outra sonicação com duração de 5 minutos. A parte sólida foi filtrada à vácuo e posteriormente seca em estufa durante 24 horas a 105 °C e pesada em balança analítica para determinação do rendimento lipídico, de acordo com o fluxograma na figura 4.



Figura 4 - Fluxograma do método Bligh; Dyer (1959)



Fonte: Dados do experimento

A produtividade e o rendimento de lipídios foram determinados de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente, descritas por Converti (2009):

$$v = \frac{C_L}{t} \quad (3)$$

Onde:

$v$  – produtividade em  $\text{g L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ,

$C_L$  – concentração de lipídios no final do experimento em  $\text{g L}^{-1}$ ,

$t$  – duração do cultivo em dias.

$$Y = \left( \frac{W_L}{W_{DA}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde,

$Y$  – rendimento em g 100 g de alga seca<sup>-1</sup>,

$W_L$  - peso de lipídeo extraído em g,

$W_{DA}$  - peso da biomassa seca no fim das culturas.

## **2.7 Análises estatísticas**

Os dados obtidos no presente trabalho foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, no caso de diferença significativa, as médias foram submetidas ao teste de Tukey para ao nível de 5%, utilizando o programa BioEstat 5.0.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Correlação entre densidade óptica (DO<sub>680nm</sub>) e peso seco (PS)

Foi obtida uma forte correlação linear ( $R^2$ ) entre as densidades ópticas e pesos secos no desenvolvimento das culturas, independente dos diferentes meio de cultivo utilizados. Assim, foi possível determinar as equações de regressão linear para as duas variáveis em todas as culturas realizadas (TABELA 4).

Tabela 4 - Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e equações de regressão linear entre DO<sub>680nm</sub> e pesos secos de *C. vulgaris* cultivada com meio Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura.

| Tratamentos                      | Equação de regressão linear | $R^2$  |
|----------------------------------|-----------------------------|--------|
| <b>Guillard</b>                  | $y = 2,0047x - 0,2713$      | 0,8472 |
| <b>Efluente (Piscicultura)</b>   | $y = 1,0646x - 0,0349$      | 0,9774 |
| <b>Efluente (Carcinicultura)</b> | $y = 0,387x + 0,0033$       | 0,9982 |

Fonte: Dados do experimento

A partir da substituição dos valores observados de DO<sub>680nm</sub> na variável independente “x” das equações de regressão linear (TABELA 4), foram calculados os respectivos valores das biomassas em  $g L^{-1}$ , representada pela variável dependente “y”, e então traçadas as curvas de crescimento de cada cultura.

#### 3.2 Curvas de crescimento

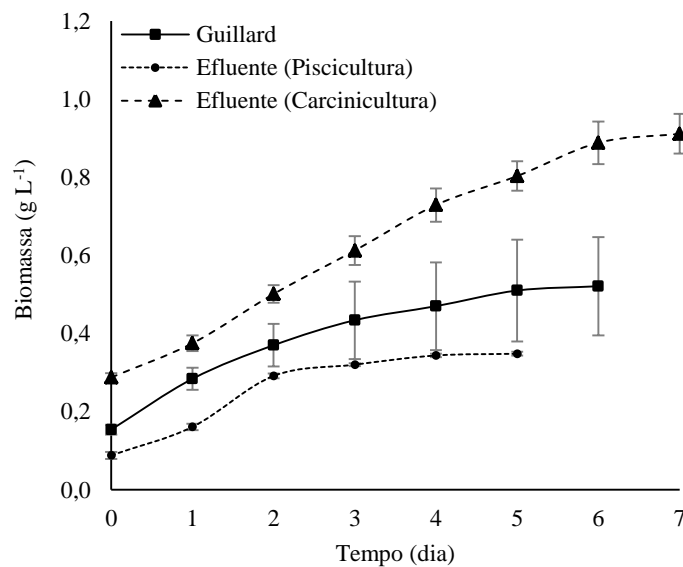
As curvas de crescimento foram determinadas por espectrofotometria no início do cultivo com média de  $0,100 \pm 0,015$  DO<sub>680nm</sub>, mas quando foi realizada a conversão, foi evidenciado que os cultivos apresentaram biomassa  $L^{-1}$  em quantidades diferentes, possivelmente, devido à quantidade variada de clorofila *a*, determinada durante a espectrofotometria, dos cultivos.

As culturas de *C. vulgaris* com os dois efluentes da aquicultura apresentaram curvas de crescimento com quatro fases de crescimento bem distintas (FIGURA 5). No entanto, a fase de indução foi de apenas um dia para ambos os cultivos com efluentes, já o cultivo com o meio Guillard f/2 não apresentou fase de indução, possivelmente pela

quantidade de nutrientes do meio de cultivo ser favorável para um rápido desencadeamento do crescimento da população algal. Dessa forma, foi possível evidenciar que as culturas apresentaram fase exponencial de crescimento em períodos distintos.

O crescimento das microalgas em meio Guillard f/2 já entrou na fase exponencial logo após a inoculação que durou apenas um dia. Em seguida, entrou na fase de redução do crescimento relativo que durou até o quinto dia de cultivo. A fase estacionária foi do quinto ao sexto dia, quando o cultivo foi finalizado. Os cultivos com efluente de piscicultura e carcinicultura apresentaram fase de indução de um dia. No entanto, no efluente de piscicultura a fase exponencial foi de apenas um dia, enquanto no cultivo com efluente de carcinicultura esta fase foi do primeiro até o quarto dia de cultivo. As culturas com efluente da carcinicultura tiveram a fase exponencial mais prolongada, devido a quantidade de nitrato ser superior ao efluente da tilápia. Além disso, o cultivo com efluente de carcinicultura apresentou as mais altas taxas de crescimento, que foram bem semelhantes, sendo essa taxa praticamente constante desde o momento da inoculação das microalgas até o final do cultivo. As culturas realizadas nos efluentes também apresentaram fases estacionárias de apenas um dia, do penúltimo ao último dia de cultivo (FIGURA 5).

Figura 5 - Curvas de crescimento de *C. vulgaris* cultivadas com meio Guillard f/2 e efluentes de carcinicultura e piscicultura.



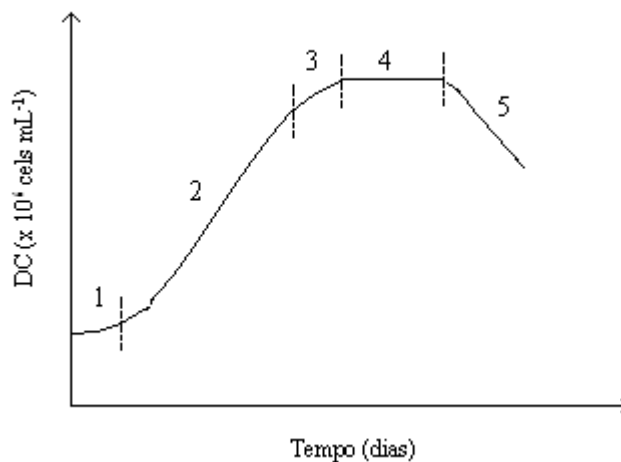
Fonte: Dados do experimento

O cultivo realizado com efluente da carcinicultura foi o que atingiu a maior quantidade de biomassa por litro cultivado com  $0,93 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$  e também foi o mais longo, com uma duração de sete dias, seguido pelo realizado em meio Guillard f/2 com  $0,52 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$  com duração de seis dias, e do realizado no efluente de piscicultura com  $0,34 \pm 0,004 \text{ g L}^{-1}$ , com uma duração de apenas cinco dias (FIGURA 5). A recuperação de biomassa da *C. vulgaris* utilizando efluente da carcinicultura como meio de cultura foi mais que duas vezes maior que o outro efluente utilizado, o de piscicultura.

Jiang-Ming *et al.* (2010), ao trocar o meio de cultura definido por um modificado aumentou a produção de *C. vulgaris* de 0,4 para  $1,20 \text{ g L}^{-1}$ , ratificando que a alteração de nutrientes pode aumentar a concentração e biomassa algal. Chen *et al.* (2012) cultivaram a *Chlorella* sp. em um efluente bovino com produção de  $0,46 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ , resultado inferior ao cultivo da *Chlorella vulgaris* com efluente de camarão do presente trabalho.

Segundo Hernandez *et al.* (2009), após a inoculação de uma microalga em meio de cultura enriquecido com nutrientes ocorre o crescimento populacional ao longo do tempo que, geralmente, apresenta uma curva com cinco fases distintas (FIGURA 6).

Figura 6 - Curva de crescimento típica de uma população de microalgas expressa em densidade celular por dia de cultivo



Fonte: FAO, 1996.

Na primeira fase, praticamente não ocorre aumento populacional devido à aclimação das células ao novo ambiente de cultivo. Na segunda fase, as células já estão aclimatadas ao novo meio e, com isso, ocorre um incremento exponencial da população algal. A terceira fase é a de desaceleração de crescimento, na qual a depleção dos nutrientes diminui a taxa de crescimento. Em seguida, com uma maior redução de nutrientes e aumento de

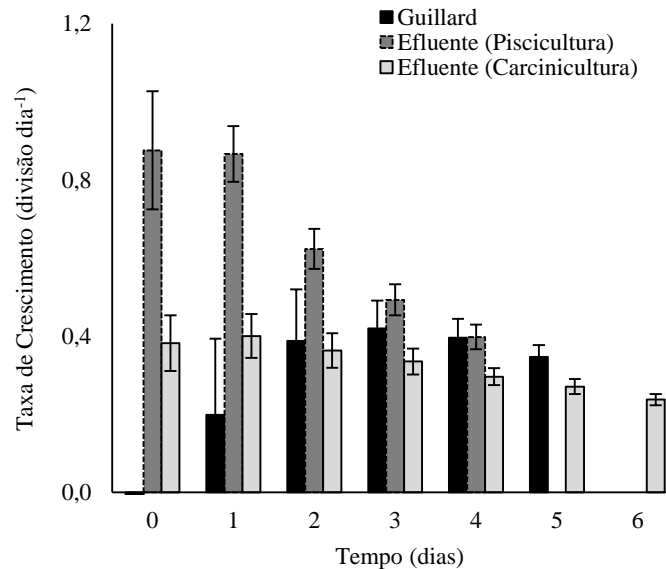
metabólitos no meio, a taxa de crescimento se iguala à taxa de mortalidade, mantendo a população constante por um determinado período, caracterizado como a fase estacionária do cultivo. Finalmente, com o completo esgotamento dos nutrientes, grande quantidade de metabólitos e autólise celular, o cultivo entra na fase de morte, resultando em uma significativa redução da população algal.

O aumento da produtividade algal depende da concentração de nutrientes, principalmente amônia, composto nitrogenado de melhor absorção pelas microalgas por não demandar gasto energético (LOURENÇO, 2006), que se encontrava em maior concentração no efluente de camarão. Modificações como a adição e depleção de nutrientes na formulação de meios de cultura e a utilização destas técnicas em efluentes da aquicultura, tornam estudos viáveis para aumentar a recuperação de biomassa das microalgas e seus compostos alvos.

Os cultivos com efluentes aquícolas apresentaram uma curva de crescimento com as fases bem definidas, mesmo sendo em períodos diferentes, tal observação será mais bem estudada em um trabalho futuro para comparar o momento mais favorável para a floculação, visando atingir máxima biomassa algal ou um determinado componente bioquímico da microalga.

Estas diferenças durante o desenvolvimento algal foram evidenciadas nas taxas de crescimento, que determinam o crescimento diário em relação à biomassa  $L^{-1}$  do dia zero de cada cultivo (FIGURA 7). Neste trabalho, as taxas de crescimento diário possuem uma relação inversa entre o crescimento relativo e o ganho real de biomassa, corroborando com esta afirmação, os resultados destas taxas foram maiores no cultivo realizado com efluente de piscicultura com  $0,398 \pm 0,032$  divisões  $dia^{-1}$  com produção algal de  $4,48 \pm 0,49$  g, seguido do meio Guillard f/2 com  $0,346 \pm 0,030$  divisões  $dia^{-1}$  com  $5,40 \pm 0,34$  e as menores taxas foram observadas nas culturas com efluente de carcinicultura com  $0,237 \pm 0,014$  divisões  $dia^{-1}$  com  $10,22 \pm 3,01$  g de biomassa (TABELA 5).

Figura 7 - Taxas de crescimento diário de *C. vulgaris* cultivada com Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura.



Fonte: Dados do experimento

### 3.3 Depleção de nutrientes durante os cultivos de *C. vulgaris*

Na presente pesquisa, com o incremento da população algal, a depleção dos nutrientes ficou bem evidente com o passar do tempo, independente da quantidade desses nutrientes no meio de cultivo (FIGURA 8).

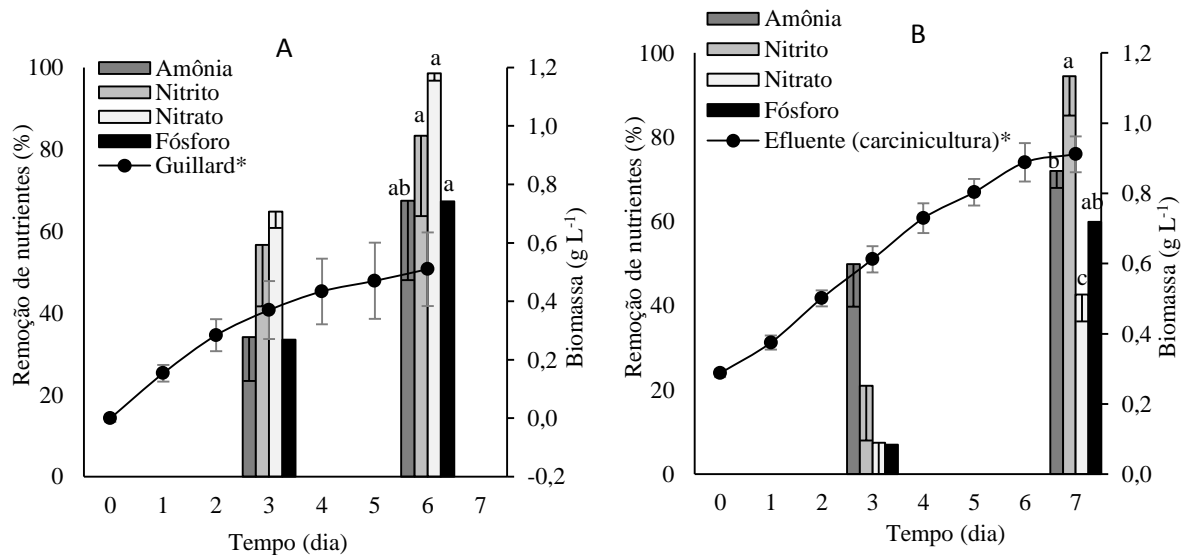
Estudos como os de Li *et al.* (2011), Kong; Zhu; Shen (2010), Wang *et al.* (2010) relatam uma desaceleração da taxa de crescimento diário em cultivos de *Chlorella* sp., à medida que ocorre o consumo dos nutrientes, principalmente nitratos e fosfatos, que são essenciais para o crescimento das algas.

Quando as culturas foram realizadas no meio Guillard f/2, as remoções médias de amônia, nitritos, nitratos e fosfatos, na fase estacionária, foram de 67,42, 83,33, 98,57 e 67,26%, respectivamente. Nesta mesma fase, as remoções médias desses nutrientes nos cultivos realizados nos efluentes da carcinicultura foram de 71,96, 94,44, 42,63 e 59,89%, respectivamente. Já nos cultivos que utilizaram os efluentes da piscicultura, as remoções médias na fase estacionária foram de 86,78, 70,00, 89,28 e 48,44% para amônia, nitritos, nitratos e fosfatos, respectivamente (FIGURA 8).

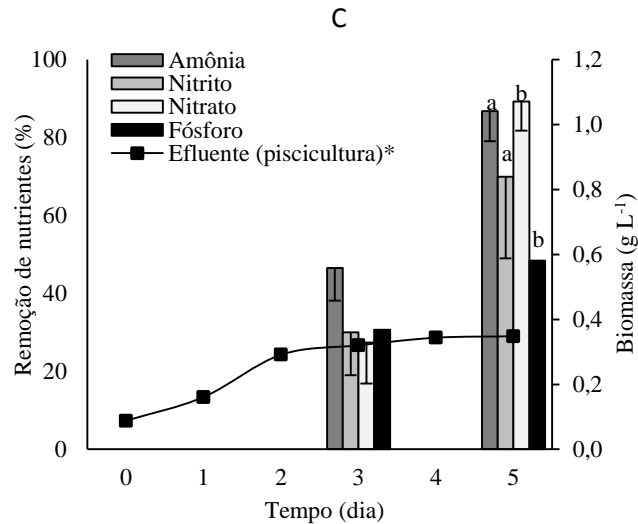
O consumo de amônia foi maior nos cultivos com efluentes, nutriente preferencialmente utilizado pelo fitoplâncton, mas o mais incorporado é o nitrato por ser a forma mais estável de nitrogênio presente na água (LOURENÇO, 2006), sendo o efluente da carcinicultura com menor porcentagem de remoção, possivelmente por ser um meio com maior quantidade de amônia, seguido pelo efluente de tilápia e Guillard f/2 com reduções de nitrato bem significativas.

O fósforo é um elemento limitante ao fitoplâncton, assim como o nitrogênio, mas tem uma menor demanda. A taxa de redução deste nutriente foi inferior, provavelmente por ser menos exigido que os compostos nitrogenados. Ao relacionar a concentração de amônia com o fósforo, observou-se que o efluente de carcinicultura apresentou maior relação entre esses compostos (9,07:1), o que possivelmente resultou em um maior crescimento da *C. vulgaris*, sendo uma relação mais favorável ao desenvolvimento algal que as dos demais meios de cultura (Guillard f/2 1,98:1; efluente da piscicultura 3,62:1).

Figura 8 - Curvas de crescimento e de remoção de nutrientes nos cultivos de *C. vulgaris* com Guillard f/2 (A), efluente de carcinicultura (B) e piscicultura (C). Letras diferentes mostram diferenças significativas na depleção de nutrientes durante o desenvolvimento das culturas.







Fonte: Dados do experimento

O acompanhamento do consumo de nutrientes em cultivos de microalgas pode ser monitorado pela determinação da concentração destes no meio de cultivo (FIERRO; SÁNCHEZ-SAAVEDRA; COPALCÚA, 2008). Abe *et al.* (2002) em um trabalho com efluente da agricultura removeram 22% de nitrito utilizando a microalga *Trentepohlia aurea*, remoção inferior aos três meios de cultura do presente trabalho, já Samori *et al.* (2013) reduziram este nutriente em quase 100% em apenas três dias de cultivo da microalga *Desmodesmus communis* em um efluente de estação de tratamento urbano, resultados semelhante à redução deste composto utilizando efluente de camarão.

Bertoldi *et al.* (2007) avaliaram o consumo de nitrato em diferentes diluições de uma solução hidropônica residuária com uma concentração inicial de  $226,50 \text{ mg L}^{-1}$  de nitrato em um experimento com *C. vulgaris*. Os autores constataram que no cultivo realizado com 25% da quantidade de nitrato da solução original as microalgas removeram 87% desse composto do meio de cultivo, enquanto nos cultivos realizados com a solução original e com 50% da concentração de nitrato, as microalgas consumiram, respectivamente, 80,5 e 80,4% do nitrato presente no meio, estes resultados são tão expressivos quanto à utilização de efluente de tilápia, que removeu em média 89,28% de nitrato.

A microalga *Chlorella vulgaris* diminuiu acentuadamente a concentração de nitrato de um efluente de uma estação de tratamento de água em apenas nove dias, passando de  $7,6 \pm 0,24$  para  $3,4 \pm 0,17 \text{ mg L}^{-1}$ , demonstrando seu alto potencial para remoção de compostos nitrogenados de águas residuárias (KIM *et al.*, 2010), assim como efluentes aquícolas.

Kumar; Miao; Wyatt (2010) utilizaram a microalga *C. vulgaris* para retirar a amônia total de um efluente de suinocultura. Segundo os autores, a concentração de amônia total foi reduzida em 54% em seis dias e, após dez dias de cultivo, a remoção foi superior a 85%, resultado semelhante ao cultivo da mesma microalga com efluente de piscicultura do presente experimento.

Charity *et al.* (2009) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em um efluente de piscicultura e observaram uma redução de 94,44% na amônia total. Os cultivos foram realizados em tanques externos de 150 L expostos as condições ambientais naturais e providos de aeração constante, demonstrando a eficiência das microalgas na remoção de compostos nitrogenados.

Li *et al.* (2013a) avaliaram a remoção de nutrientes em um efluente de fermentação rico em ácido cítrico pela *C. vulgaris* e constataram uma remoção de 47,6 e 10,4 para amônia e fósforo, respectivamente. Os mesmos autores, Li *et al.* (2013b), em um outro estudo utilizaram efluente da estação de tratamento municipal e observaram uma alta eficiência da *C. vulgaris* na remoção de nutrientes com 98 e 90% na redução dos mesmos compostos do trabalho anterior. Em ambos os estudos a *C. vulgaris* removeu amônia e fósforo, mas dependendo do tipo de efluente a remoção apresentou valores diferenciados, assim como no presente experimento, onde a remediação destes compostos foram diferentes nos três tipos de meio de cultura.

Woertz *et al.* (2009) utilizaram um efluente urbano com diluição de 10 e 25% em um cultivo misto de clorofíceas e diatomáceas. Em quinze dias de experimento, as microalgas removeram mais que 96% de amônia e 99% de fosfato em ambas as diluições do efluente.

Feng; Li; Zhang (2011) observaram uma remoção de 97% na amônia e de 96% no fósforo no cultivo de *C. vulgaris*, utilizando água residuária artificial como meio de cultivo. A grande eficiência na remoção de compostos nitrogenados e fosfatados torna essa espécie bastante promissora para o tratamento de efluentes. Li *et al.* (2011) mostraram que após 14 dias de cultivo da microalga *Chlorella* sp., a mesma foi capaz de remover 93,9 e 89,1% do nitrogênio amoniacal e fósforo totais, respectivamente.

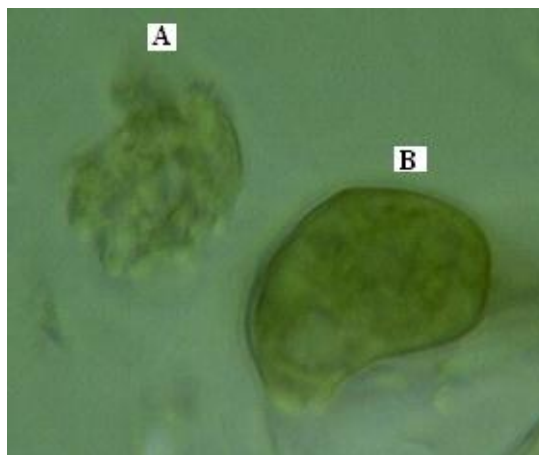
O presente experimento mostrou a eficiência da *C. vulgaris* na remoção de nutrientes de efluentes gerados pela aquicultura, com resultados semelhantes aos encontrados na literatura. O uso de algas nativas, assim como a *C. vulgaris*, na fitorremediação de efluentes aquícolas é muito importante porque já são algas resistentes e bem adaptadas às condições naturais. A relação entre os nutrientes deve ser mais bem estudada para avaliar

melhor o crescimento das microalgas e aumentar a eficiência na formulação dos meios de cultivo.

### 3.4 Produção de biomassa e lipídios por *C. vulgaris*

O processo de sonicação é necessário para otimizar a extração de lipídios das células de *C. vulgaris* devido a espécie possuir celulose na parede celular. Dessa forma, após a sonicação, ocorre o rompimento da parede e membrana celular, facilitando a saída dos componentes celulares (Figura 9).

Figura 9 - Célula da *C. vulgaris* sem membrana depois da sonicação (A) e célula com membrana celular intacta (B).



Fonte: Arquivo pessoal.

Com a ruptura da membrana celular todo o conteúdo interno da microalga ficou disponível para extração e, posteriormente para determinação da recuperação de biomassa e produção de lipídios. O método de sonicação possui alta eficiência e baixo requerimento energético, tornando-o viável. Esta técnica tem sido bastante utilizada para extrair diversas substâncias de baixo peso molecular e para compostos bioativos de vegetais (MACÍAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

Os parâmetros de rendimento cinético e lipídico das culturas de *C. vulgaris* com diferentes meios de cultivo mostraram que a redução dos nutrientes nos meios de cultura resultou no aumento da produção de alga seca, da produtividade lipídica diária e do rendimento lipídico (TABELA 5).

Tabela 5 – Parâmetros de rendimento cinético e lipídico dos cultivos de *Chlorella vulgaris* em Guillard f/2, efluente de carcinicultura e piscicultura.

| Tratamento                       | Taxa de crescimento (divisões dia <sup>-1</sup> ) | Produção total de alga seca (g) | Produtividade algal (g L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ) | Rendimento lipídico (g 100g de alga seca <sup>-1</sup> ) | Produtividade lipídica (g L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------|---|---------------------------------|--|--|---|
| <b>Guillard f/2</b>              | 0,346 ± 0,030 <sup>b</sup>                        | 5,40 ± 0,34 <sup>b</sup>        | 0,080 ± 0,005 <sup>b</sup>                                 | 13,224 ± 1,696 <sup>a</sup>                              | 0,011 ± 0,002 <sup>b</sup>                                    |
| <b>Efluente (Carcinicultura)</b> | 0,237 ± 0,014 <sup>b</sup>                        | 10,22 ± 3,01 <sup>a</sup>       | 0,129 ± 0,036 <sup>a</sup>                                 | 3,457 ± 0,719 <sup>b</sup>                               | 0,005 ± 0,001 <sup>c</sup>                                    |
| <b>Efluente (Piscicultura)</b>   | 0,398 ± 0,032 <sup>a</sup>                        | 4,48 ± 0,49 <sup>b</sup>        | 0,078 ± 0,009 <sup>b</sup>                                 | 12,693 ± 1,423 <sup>a</sup>                              | 0,025 ± 0,002 <sup>a</sup>                                    |

\*Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos (p<0,05).

Fonte: Dados do experimento.

A produtividade algal foi maior com o efluente de camarões, possivelmente pela maior concentração de amônia em sua composição, já os cultivos com Guillard f/2 e efluente da piscicultura apresentaram produtividades bem semelhantes e cerca de 1,5 vezes inferiores da obtida no efluente de carcinicultura (TABELA 5). Esses últimos apresentaram baixos teores de amônia em sua composição. Inversamente aos resultados de produtividade algal, os rendimentos lipídicos foram bem mais elevados no Guillard f/2 e efluente da piscicultura, devido a menor quantidade de amônia presente nestes dois meios. Como o efluente da carcinicultura tinha uma maior concentração deste nutriente a microalga apresentou maior desenvolvimento e não acumulou lipídio como reserva energética, diferente dos outros dois meios de cultura (TABELA 5). A salinidade (30 ppt) deste meio de cultura também pode ter interferido na produção lipídica por ter uma densidade maior que a água doce, com isso as células não precisaram produzir maior quantidade de óleo para flutuabilidade.

Dessa forma, o meio de cultivo mais indicado para uma possível aplicação em escalas maiores é o efluente de piscicultura, pois apresentou uma produtividade lipídica mais elevada e atingindo a concentração celular máxima em apenas quatro dias, diminuindo a possibilidade de contaminação das culturas por outros organismos, bem como os custos com nutrientes. Por outro lado, as culturas realizadas com Guillard f/2 e efluentes aquícolas apresentaram produtividades de óleo, em L ha<sup>-1</sup>, mais elevadas que outras oleaginosas usadas como fonte para a produção de biodiesel (TABELA 6).

Tabela 6 – Comparação de algumas fontes de biodiesel\*.

| Fonte  | Rendimento de óleo<br>(L ha) |
|--|------------------------------|
| Milho  | 172                          |
| Soja   | 446                          |
| Canola   | 1.190                        |
| Pião Manso                                     | 1.892                        |
| Coco   | 2.689                        |
| Óleo de Palma                                  | 5.950                        |
| Microalga <sup>a</sup>                         | 58.700                       |
| Microalga <sup>b</sup>                         | 136.900                      |
| <i>C. vulgaris</i> Guillard f/2 <sup>+</sup>   | 36.660                       |
| <i>C. vulgaris</i> Carcinicultura <sup>+</sup> | 16.655                       |
| <i>C. vulgaris</i> Piscicultura <sup>+</sup>   | 83.333                       |

<sup>a</sup> 30% de óleo do total de peso seco; <sup>b</sup>70% de óleo do total de peso seco;

<sup>+</sup> Presente trabalho;

\*Modificado de Chisti (2007).

Os rendimentos lipídicos foram, em média, 13,22, 12,69 e 3,45% para o meio de cultura Guillard f/2, efluente da piscicultura e da carcinicultura, respectivamente. Estes resultados diferiram dos resultados encontrados na literatura utilizando efluentes como meio de cultura para a microalga *C. vulgaris*. Possivelmente, esta variação ocorreu pelas diferentes condições experimentais.

Ruiz-Martinez *et al.* (2012) destacaram a produtividade algal utilizando efluentes domésticos, a produtividade dos cultivos foram  $1,85 \times 10^9$ ,  $3,82 \times 10^6$  e  $7,11 \times 10^8$  cels mL<sup>-1</sup>, para clorofíceas, diatomáceas e cianofíceas. Em doze dias de cultivo da *C. vulgaris* em efluentes de estação de tratamento, a produção algal máxima foi de 1,5 g L<sup>-1</sup> de um efluente aeróbico e de 1,2 g L<sup>-1</sup> de um efluente de tratamento anaeróbico (CABANELAS *et al.*, 2013). Esses resultados corroboram com o presente experimento, provando que é possível uma recuperação de biomassa algal utilizando efluentes.

He *et al.* (2013) utilizaram diferentes tipos de efluentes urbanos, com concentrações variadas de amônia e obtiveram 1,1 a 1,9 g L<sup>-1</sup> de biomassa de *C. vulgaris*. Os mesmo autores também encontraram rendimentos de ácidos graxos de 35,6 até 57,5% demonstrando a eficiência da *C. vulgaris* em acumular lipídios quando cultivada em efluentes.

A utilização de efluentes com baixas concentrações de amônia obrigaram a *C. vulgaris* acumular lipídios como fonte de energia, com isso, esse procedimento de depleção de nutrientes é necessário para aumentar a produtividade lipídica. Com a redução de nitrato de

sódio no meio de cultivo de *C. vulgaris*, Silva (2011) encontrou melhores rendimentos lipícos nas menores quantidades de nitrato.

Doan; Sivaloganathan; Philip (2011) realizaram um estudo para avaliar o potencial de algumas microalgas marinhas como matéria prima para produção de biodiesel. Os resultados revelaram que a microalga *Nannochloropsis* sp. apresentou tanto a maior concentração de biomassa seca ( $0,4 \pm 0,003 \text{ g L}^{-1}$ ) como também o maior rendimento lipídico (44,9%), tornando-a bastante favorável como fonte na produção de biodiesel.

Yeesang; Cheirsilp (2011) avaliaram o conteúdo lipídico de quatro microalgas verdes identificadas como *Botryococcus* spp., que foram cultivadas em um meio rico em nitrogênio, tendo como melhor resultado um rendimento lipídico de 25,8%, já no cultivo com deficiência do mesmo nutriente o rendimento mais elevado passou para 35,9%. Feng; Li; Zhang (2011) obtiveram um teor lipídico de 42% ao cultivar *C. vulgaris*, utilizando meio artificial com águas residuárias. Segundo os autores, essa microalga mostrou-se bastante promissora como matéria prima para a produção de biodiesel.

Feng; Li; Zhang (2011) avaliaram o rendimento lipídico em três fases de um cultivo semi-contínuo de *C. vulgaris* com efluente urbano e observaram que houve um aumento significativo de 20%, na primeira fase, para 42% na segunda fase, e, em seguida, desceu ligeiramente para 38% na terceira fase. A maior produtividade de lipídios ( $147 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) foi obtida durante a segunda fase em comparação com a primeira ( $44 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) e a terceira ( $79 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ), demonstrando que a *C. vulgaris* apresenta ótimo rendimento lipídico e um bom potencial para produção de biocombustível.

O rendimento lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* também foi investigado por Yeh; Chang (2012) em diferentes meios e condições de cultivo, oriundos de estação de tratamento municipal, os métodos do seguinte experimento foi o crescimento fototrófico ( $\text{NaHCO}_3$  ou  $\text{CO}_2$ , com luz), heterotrófico (glucose, sem luz), fotoheterotrófico (glucose, com a luz) e mixotróficas (glucose e  $\text{CO}_2$ , com luz). O maior teor de lipídios (40-53%) e maior produtividade lipídica (67-144 mg/L/d) foram obtidos sob condições de cultivo mixotróficas.

A produção de biodiesel tendo como fonte as microalgas é uma excelente alternativa ao petro-diesel, além de remover compostos nitrogenados e fosforados de efluentes, sequestrar o  $\text{CO}_2$  e produzir  $\text{O}_2$  elas possuem alta concentração de lipídios, sustentabilidade ambiental e potenciais vantagens sobre outras fontes de biocombustíveis. No entanto, questões pertinentes sobre a viabilidade comercial de produção em grande escala ainda precisam ser respondidas.

#### **4 CONCLUSÃO**

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* é uma excelente forma de tratar efluentes da aquicultura, incrementar sua recuperação de biomassa e na produção de lipídios. Essa estratégia pode ser utilizada em uma produção em larga escala, o que torna a espécie uma candidata bastante promissora para a produção de biodiesel.

## REFERÊNCIAS

- ABE K.; IMAMAKI A.; HIRANO . Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 2, p 129-134, April 2002.
- AZMA, M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMAD, R.; RAHIM, R. A.; ARIFF, A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 187-195, Jan 2011.
- BALOI M.; ARANTES R.; SCHVEITZER R.; MAGNOTTI C.; VINATEA L. Performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* raised in biofloc systems with varying levels of light exposure. **Aquacultural Engineering**, v. 52, n. 1, p. 39-44, Jan 2013.
- BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1611-1627, Mar 2010.
- BERBEROGLU, H.; GOMEZ, P. S.; PILON, L. Radiation characteristics of *Botryococcus braunii*, *Chlorococcum littorale*, and *Chlorella* sp. used for CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, v. 110, n. 17, p. 1879-1893. Nov 2009.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B.; REBELO, A. M. Biorremoc o de nitrogênio e fósforo da solu o hidrop nica residual por meio da microalga *Chlorella vulgaris*. **Evidência**, v. 7, n. 2, p. 85-92, jul 2007.
- BEIYERINCK, M. W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v. 48, n. 45, p. 725-785, Nov 1890.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **G neros de algas continentais do Brasil (chave para identifica o e descri oes)**, São Carlos: Rima, v. 2, p. 03-06, 2006.
- BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.
- BOSCOLO W. R.; HAYASHI C.; MEURER A. F. F.; SIGNORI A. A. Composi o química e digestibilidade aparente da energia e nutrientes da farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápias, para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, p.2579-2586, dez, 2008.
- BOSMA R. H.; VERDEGEM M. C. G. Sustainable aquaculture in ponds: Principles, practices and limit. **Livestock Science**, v. 139, n 1–2, p. 58-68, July 2011.
- CABANELAS I. T. D.; RUIZ J.; ARBIB Z.; CHINALIA F. A.; GARRIDO-PÉREZ.; ROGALLA F.; NASCIMENTO I. A.; PERALES J. A. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal **Bioresource Technology**. v. 131, p. 429 – 436, March 2013.



- CHARITY, E. A. R.; ALEXANDRA, L. V. B.; CARMEN, H. C. L.; EVER, D. M. A. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. **Revista Tecnica de la Facultad de Ingenieria Universidad del Zulia**. v. 32, n. 2, p. 126 - 134, Aug 2009
- CHEN, C. Y.; YEH, K. L.; AISYAH, R.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, Jan 2011a.
- CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; SIMON, K. Y.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 2. p. 1649-1655, Jan 2011b.
- CHEN B. R.; LI C. R.; DEITZ A. I.; LIU A. Y.; R. STEVENSON B. J.; LIAO A. W. Freshwater algal cultivation with animal waste for nutrient removal and biomass production. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, n. 1 p. 128 – 138, April 2012.
- CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v. 50, n. 3, p. 324-329, July 2006.
- CHIAIESE P.; PALOMBA F.; TATINO F.; LANZILLO C.; PINTO G.; POLLIO A.; FILIPPONE E. Engineered tobacco and microalgae secreting the fungal laccase POXA1b reduce phenol content in olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 6–7, p. 540-546, Dec 2011.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, May 2007.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, Mar 2008.
- CHO, S.; LUONG, T. T.; LEE, D.; OH, Y-K.; LEE, T. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 18, p. 8639-8645, Sep 2011.
- CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, v.220, p.355–366, 2003.
- COELHO A. A. C. Cultivo integrado de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a microalga *Spirulina platensis*: uma alternativa para tratamento de efluente aquícola. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, 2012
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, June 2009.
- COSTA, J. A. V.; RADMANN, E. M.; CERQUEIRA, V. S.; SANTOS, G. C.; CALHEIROS, M. N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima*

cultivadas em diferentes condições. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 4, p. 429-436, out 2006.

CRAB, R.; AVNIMELECH, Y.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**, v.270, n.1-4, p.1-14, 2007

CRAB, R.; DEFOIRDT, T.; BOSSIER, P.; VERSTRAETE, W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356–357, n. 1, p. 351-356, Aug 2012.

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

DEVAPPA, K. R.; MAES, J.; MAKKAR, H. P. S.; De GREYT, W.; BECKER, K. Quality of biodiesel prepared from phorbol ester extracted *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 87, n. 6, p. 697-704, Feb 2010.

DOAN, T. T. Y.; SILVALOGANATHAN, B; PHILIP, J. Screening of marine microalgae for biodiesel feedstock. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2534-2544, July 2011.

DRAGONE, G.; FERNANDES, B. D.; ABREU, A. P.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3331-3335, Oct 2011.

FAULWETTER J. L.; GAGNON V.; SUNDBERG C.; CHAZARENC F.; BURR M. D.; BRISSON J.; CAMPER A. K.; STEIN O. R. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. **Ecological Engineering**, v. 35, n. 6, p. 987-1004, June 2009.

FENG, D.; CHEN, Z.; XUE, S.; ZHAND, W. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 12, p. 6710-6716, June 2011a.

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

FIERRO, S.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M. P.; COPALCÚA, C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 5, p. 1274-1279, Mar 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture**. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture Department, n. 361, p. 14-15, 1996.

GAO, C.; ZHAI, Y.; DING, Y.; WU, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756-761, Mar 2010.

GJEDREM T.; ROBINSON N.; RYE M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein: A review. **Aquaculture**, v. 350-353, n. 1, p. 117-119, June 2012.

GORS, M.; SCHUMANN, R.; GUSTAVS, L.; KARSTEN, U. The potential of ergosterol as chemotaxonomic marker to differentiate between “*Chlorella*” species (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 46, n. 6, p.1296-1300, Nov 2010.

GOUVEIA, L.; BATISTA, A. P.; MIRANDA, A.; EMPIS, J.; RAYMUNDO, A. *Chlorella vulgaris* biomass used as colouring source in traditional butter cookies. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 433-436, Sep 2007

GUEDES, A . C.; MEIRELES, L. A.; AMARO, H. M; MALCATA, F. X. Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 87, n. 7, p. 791-801, Mar 2010.

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

GUIMARÃES I.G; PEZZATO L.E.; BARROS M.M.; TACHIBANA L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 39, n. 6, p. 781-789, Dec 2008.

HE P. J.; MAOA B.; SHEN C. M.; SHAO L. M.; LEE D. J.; CHANG J. S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 177 - 181, Feb 2013.

HERNADEZ, J-P.; de BASHAN, L. E.; RODRIGUEZ, D. J.; RODRIGUEZ, Y.; BASHAN, Y. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 88-93, Jan 2009.

HONDA R.; BOONNORAT J.; CHIEMCHAISRI C.; CHIEMCHAISRI W.; YAMAMOTO K. Carbon dioxide capture and nutrients removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 59-64, Dec 2012.

JANCZYK, P.; FRANKE, H.; SOUFFRANT, W.B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1-2, p. 163-169, Jan 2007.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3336-3341, Oct 2011.

JIANG-MING, L.; LI-HUA, C.; XIN-HUA, X.; LIN, Z.; HUAN-LIN, Z. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, Sep. 2010

KALIKOSKI C. D.; SEIXAS C. S.; ALMUDI T. Gestão compartilhada e comunitária da pesca no Brasil: avanços e desafios. **Ambiente & Sociedade**, v. 12, n. 1, p. 151-172, jan 2009.

KIM, J.; LINGARAJU, B. P.; RHEAUME, R.; LEE, J-Y.; SIDDIQUI, K. F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, v. 15, n. 4, p. 391-396, Aug 2010.

KONG, Q.; ZHU, L.; SHEN, X. The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n. 1-3, p. 282-286, June 2010.

KUBTIZA, F. O status atual e as tendências da tilapicultura no Brasil. **Panorama da Aquicultura**, v. 21, n. 124, p.10-19, Mar 2011.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, K. S. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, Aug 2010.

LI C.; YANG H.; XIA X.; LI Y.; CHEN L.; ZHANG M.; ZHANG L.; WANG. High efficient treatment of citric acid effluent by *Chlorella vulgaris* and potential biomass utilization. **Bioresource Technology**, v. 127, n. 1, p. 248 – 255, Jan 2013a

LI C.; YANG H.; LI Y.; CHEN L.; ZHANG M.; ZHANG L.; WANG. Novel bioconversions of municipal effluent and CO<sub>2</sub> into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. **Bioresource Technology**, v. 132, n. 1, p. 171 – 177, March 2013b.

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, n. 8, p. 5138-5144, Apr 2011.

LIM, S. L.; CHU, W. L.; PHANG, S. M. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7314-7322, Oct 2010.

LIU, Z. Y.; WANG, G. C.; ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4717-4722, July 2008.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**, São Carlos: Rima, v. 1, p. 295-315, 2006.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZA, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSAA, E.; LUBIÁN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n 30, p. 948-952, Jan 2009.

MAIA L. J. Técnicas para o gerenciamento quanti-qualitativo de reservatórios com usos múltiplos da água: estudo de caso do reservatório de Barra Bonita – SP. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Universidade de São Paulo, 2009.

MARINHO-SORIANO E.; AZEVEDO C. A. A.; TRIGUEIRO T. G.; PEREIRA D. C.; CARNEIRO M. A. A.; CAMARA M. R. Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 253-257, Jan. 2011 .

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389–3401, Oct 2011.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renew Sustain Energy Reviews**, v.14, n. 1, p. 217-232, Jan 2010.

MARENGO J. A.; Água e mudanças climática. **Estudos avançados**. V. 22, n. 63, p. 83-96, Ago 2008.

MEINERZ, L. I.; BALLESTER, E. L.C.; VAZ, L. J.; WASIELESKY, W. JR. Efeitos da temperatura sobre a absorção de nutrientes e crescimento celular da microalga *Thalassiosira weissflogii*. **Atlântica**, v. 31, n. 2, p. 209-212, jun 2009.

MICHAEL A. I.; RIZZO L.B.; MCARDILL C. S.C.; MANAIA C. M. D.; MERLIN C. E.; SCHWARTZ T. F.; DAGOT C. G.; FATTA-KASSINOS D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. **Water Research**, v. 47, n. 3, p. 957-995, Mar 2013

MIRANDA-FILHO K. C.; PINHO G. L. L.; WASIELESKY JR. W.; BIANCHINI A. Long-term ammonia toxicity to the pink-shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **Toxicology & Pharmacology**, v.150, n. 3, p. 377-382, Sep 2009.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**. v. 48, n. 7, p. 2169-2173, July 2007.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, jul 2008.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; BUYER, J.; LUTHRIA, D. L. Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 86, n. 9, p. 909-915, July 2009.

NEDBAL L.; TRTÍLEK M.; CERVENY J.; KOMÁREK O.; PAKRASI H.B. A photobioreactor system for precision cultivation of photoautotrophic microorganisms and for high-content analysis of suspension dynamics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100 n. 5, p. 902–910, 2008.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, jun 2008.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; BRAGA, M. V. C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1760-1767, set 2009.

PIEDRAHITA, R.H. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. **Aquaculture**, v. 226, n.1-4, p. 35-44, 2003.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3307-3312, Oct 2011.

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, set 2008.

RIBEIRO E. M.; GALIZONI F. M. Água, população rural e políticas de gestão: o caso do vale do Jequitinhonha, Minas Gerais. **Ambiente & Sociedade**, v. 5, n. 2 p. 129-146, jan 2003.

RICHARDS R.G.; MULLINS B.J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. **Ecological Modelling**, v. 249,n. 24, p. 59-67, Jan 2013.

RUIZ-MARTINEZ A.; MARTIN GARCIA N.; ROMERO I.; SECO A.; FERRER J. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. **Bioresource Technology**. v. 126, p. 247-253, Dec 2012.

SAMORÌ G.; SAMORÌ C.; GUERRINI F.; PISTOCCHI R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, v. 47, n. 2, 1, p. 791-801, Feb 2013.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S.; HORST, I.; HOWE, C. J.; SMITH, D. J. L.; SMITH, A. G. Biodiesel from algae: challenges and prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 277-286, June 2010.

SEBASTIEN, N. Y.; GRANJA, R. P.; cultivo de *Scenedesmus*: alimento vivo para a manutenção de organismos planctônicos e implementação na dieta humana. **Revista Varia Scientia**, v. 05, n. 10, p. 113-121, mar 2006.

SILVA, B. C.; ANDRE, R. C.; BELETTINI, F.; BUGLIONE, C.C.; JATOBÁ, A.; VIEIRA, F.N.; ANDREATTA, E.R.; DERNER, R.B.; MOURIÑO1, J.L. Utilização de *Thalassiosira weissflogii* em larvicultura de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Atlântica**, v. 31, n. 1, p. 39-50, nov 2009.

SILVA, J. W. A. Teor lipídico da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada com diferentes quantidades de nitrato de sódio. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, 2011.

SILVA, J. W. A.; ARAUJO, G. S.; COSTA, F. T. M.; LAGE, L. P. A.; FARIAS, W. R. L. Diferentes concentrações de nitrato no meio Guillard f/2 para avaliação do rendimento de

biomassa seca da microalga *Chlorella vulgaris*. In: Aquaciência 2010 – IV Congresso da sociedade brasileira de aqüicultura e biologia aquática, 2010, Recife.[**Anais...**]. Recife: [s.n.], 2010.

SILVA, B.; TORZILLO G. Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 2, p 267-276, April 2012.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 106p, 2003.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu12 e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 111-118, mai 2009.

SUBHADRA, B, EDWARDS, M. An integrated renewable energy park approach for algal biofuel production in United States. **Energy Policy**, v. 38, n. 9, p. 4897-902, Sep 2010.

SUGIURA, S.H.; MARCHANT, D.D.; KELSEY, K.; WIGGINS, T.; FERRARIS, R.P. Effluent profile of commercially used low-phosphorus fish feeds. **Environmental Pollution**, v. 140, n. 1 p. 95-101, Mar 2006.

SYDNEY, E. B.; SILVA, T. E.; TOKARSKI, A.; NOVAK, A. C.; CARVALHO, J. C.; WOICIECOHWSKI, A. L.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3291-3294, Oct 2011.

TUNDISI J. G.; Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos avançados**. V. 22, n. 63, p. 07-16, Ago 2008.

URI, P.; TATYANA, Z.; MEIRA, W. Accumulation of triglycerides in green microalgae: a potential source for biodiesel. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 277, n. 1, p. 5–36, Jan 2010.

VALENTI, W.C. Aquicultura sustentável. **Congresso de Zootecnia**, 12º, Vila Real, Portugal, 2002.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, out 2009.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; ANNA, E. S. S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39 n. 1, p. 98-101, Jan 2008.

WANG, H. M.; PAN, J. L.; CHEN, C. Y.; CHIU, C. C.; YANG, M. H.; CHANG, H. W.; CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by

antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 12. p. 1865-1872, Dec 2010a.

WANG, L.; LI, Y.; CHEN, P.; MIN., M.; CHEN, Y.; ZHU, J.; RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2623-2628, Apr 2010b.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13-20, Jan 2009.

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, n. 11, p. 1115-1122, Nov 2009.

YANG, J; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 1, p. 159-165, Jan 2011.

YEESANG, C.; CHEIRSILP, B. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3034-3040, Feb 2011.

YEH A. K. L.; CHANG J. S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120 – 127, Feb 2012.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, Aug 2011.