



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE ENERGIAS ALTERNATIVAS E RENOVÁVEIS**



**PATRÍCIA GIULIANNA PETRAGLIA SASSI**

**USO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA  
PRODUÇÃO DE BIODIESEL E MITIGAÇÃO DE  
IMPACTOS AMBIENTAIS**

**JOÃO PESSOA – PB**  
**2016**

**PATRÍCIA GIULIANA PETRAGLIA SASSI**

**USO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE  
BIODIESEL E MITIGAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energias Renováveis da Universidade Federal da Paraíba, do Centro de Energias Alternativas e Renováveis da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Energias Renováveis.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Abrahão  
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Sassi

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

S252u Sassi, Patrícia Giulianna Petraglia.  
    Uso de microalgas com potencial para produção de  
    biodiesel e mitigação de impactos ambientais / Patrícia  
    Giulianna Petraglia Sassi.- João Pessoa, 2016.  
    137f. : il.  
    Orientador: Raphael Abrahão  
    Coorientador: Roberto Sassi  
    Dissertação (Mestrado) - UFPB/CEAR  
    1. Energias renováveis. 2. Microalgas. 3. Ácidos graxos.  
    4. Citometria de fluxo. 5. Fisiologia celular. 6. Meio alternativo.

UFPB/BC

CDU: 620.91(043)

**PATRÍCIA GIULIANA PETRAGLIA SASSI**

**USO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE  
BODIESEL E MITIGAÇÃO DE IMPACTOS AMBIENTAIS**

Dissertação apresentada em 29 de abril de 2016

---

Prof. Dr. Raphael Abrahão – DEER /CEAR/UEPB  
Orientador

---

Prof. Dr. Roberto Sassi - DSE/CCEN/UEPB  
Coorientador

---

Profa. Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano - DQ/CCEN/UEPB  
Examinador externo

---

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes - DB/CBiotec/UEPB  
Examinador externo

---

Profa. Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua - DBM/CCEN/UEPB  
Examinador suplente externo

---

Profa. Dra. Silvia Layara Floriani Andersen - DEER/CEAR/UEPB  
Examinador suplente interno

**JOÃO PESSOA – PB**

**2016**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre me guiar e mostrar caminhos de luz através do amor ao próximo;

Agradeço à minha amada família que sempre estiveram presentes na minha educação, me ensinando valores preciosos como agir sempre com ética e respeito, a ter dignidade e humildade, a conviver com as diferenças e amar todas as formas de vida possível. O ser humano que hoje sou é por causa de vocês. Obrigada por todas as palavras de incentivos, cuidados, apoio e preocupação com minha vida, inclusive a profissional. A realização dessa dissertação, eu devo a vocês. Amo vocês! (Roberto, Rosa, André, Renato, Elisa, Katharina, Lena, Cristiane, Giuliano).

Aos meus melhores amigos (Vinícius, Cyntya, Derek, Elói, Rachel, Andréa, Jéssica, Mago, Gabi, Pedro, Tito, Laerte, Túlio, Amanda, Renata, Priscilinha) obrigada pelos vários momentos sempre alegres que me proporcionaram, pelo apoio que ofereceram para o andamento desta dissertação, por sempre acreditar em mim e por compreender os meus momentos de ausência e estresses (ahaha). Amo vocês também, afinal quem tem amigos tem tudo ou nunca está só!

Agradeço ao pessoal do laboratório, Aline, Patrícia, Evandro, Roberta, Alerson, Gabriel, Karine, Vilma, Vânia, por sempre me apoiarem e sempre criar um ambiente de trabalho cheio de harmonia. Mas os principais agradecimentos são para Clediana, Jordilene, Vivi e Nyelson, muito obrigada por toda ajuda, por dedicarem preciosas horas dos seus tempos para me auxiliar nesta pesquisa, podem ter certeza que o fruto dessa dissertação eu também devo a vocês.

Aos colegas que ganhei durante o mestrado, principalmente Kalyne, com quem pude criar um verdadeiro vínculo de amizade;

Obrigada a todos os professores do programa de pós-graduação em energias renováveis por todos os conhecimentos oferecidos durante o mestrado e, em especial, as professoras Silvia Andersen e Flávia Medeiros, por estarem sempre dispostas a ajudar e por serem seres extremamente iluminados que além de transmitirem valiosos conhecimentos sobre a ciência, me ensinaram a ser um ser humano melhor;

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Raphael, por ter me aceitado a orientação, por todos conhecimentos científicos transmitidos durante o mestrado, incentivo à pesquisa, por ter depositado confiança e por ter sido

extremamente paciente e ter compreendido todos os impasses ocorridos para a finalização deste trabalho;

À professora Mirella da Silva, Helene Hegaret e Philippe Soudant por todo conhecimento científico sobre uma área da biologia que eu nunca cogitei a possibilidade de trabalhar e graças a vocês, passei a amar essa linda área que é a biologia e fisiologia celular. Muito obrigada por todos os ensinamentos;

Agradeço a professora Ilda e ao professor Ulrich por terem aceito o convite de participação da banca examinadora;

Ao Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) (Processo: 2557/09) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante os 2 anos de mestrado.

## RESUMO

As microalgas têm sido foco de grande interesse para a produção de biocombustíveis devido a sua enorme capacidade de produzir biomassa, e pelo fato de muitas espécies produzirem ácidos graxos em quantidades muitas vezes superiores à várias oleaginosas. Muitas microalgas também atuam como eficientes biorremediadores de resíduos domésticos e agroindustriais, de maneira que sistemas integrados de cultivo de microalgas promissoras para a produção de biocombustíveis acoplados ao tratamento de efluentes podem apresentar vários benefícios incluindo redução de custos no tratamento de águas residuais e produção de biomassa microalgal, barateando os cultivos, promovendo remoção de nutrientes e minimizando impactos ambientais. Esta pesquisa visou avaliar a efetividade de microalgas regionais atuarem na biorremediação de três tipos de efluentes: água de lavagem de biodiesel, efluente de carcinicultura e água de drenagem agrícola, utilizando espécies potencialmente promissoras à produção de biodiesel que podem crescer nesses efluentes como meio de cultura. Foram utilizadas 12 espécies de microalgas isoladas de vários ambientes aquáticos do Nordeste do Brasil sendo 11 dulcícolas e uma marinha. A seleção das espécies foi feita considerando-se aquelas que produzem substanciais quantidades de ácidos graxos, com algumas inclusive superiores à soja. Os experimentos foram realizados em câmara de cultura climatizada ( $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12h) em balões de 6L de capacidade com aeração contínua. O crescimento das espécies nas condições testadas foi acompanhado por contagens celular e medidas da fluorescência *in vivo* e as respostas fisiológicas por citometria de fluxo. Nos efluentes foram determinados os teores de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{PO}_4$ , pH, DQO, turbidez, condutividade elétrica e sólidos totais usando procedimentos analíticos e/ou sonda multiparâmetros. Em água de lavagem de biodiesel foram testadas 11 espécies, das quais apenas duas apresentaram bom crescimento. Destas, *Monoraphidium contortum* foi selecionada para os testes de biorremediação por apresentar maior capacidade de crescimento e ser a segunda espécie com maior teor de ácidos graxos. Constatou-se que esta espécie reduz as concentrações de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , e DQO nas porcentagens de 25,8%, 7,2% e 31,2%, respectivamente. Em água de carcinicultura o gênero *Amphora* sp. mostrou crescimento considerável, porém inferior ao controle com produção de lipídeos superior. A remoção de  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$  por esta espécie nesse efluente foi de 73,357%, 72,572% e 66,667%, respectivamente. Em água de drenagem agrícola foram testadas 11 espécies das quais *M. contortum* foi selecionada para o ensaio de biorremediação e sua produção de biomassa e o rendimento final em número de células nesta condição experimental foram inferiores ao controle. Neste efluente essa espécie removeu aproximadamente 73% de  $\text{NO}_3$  e 100% de  $\text{PO}_4$ . As comparações das respostas fisiológicas demonstraram concentrações celulares, fluorescência da clorofila e atividade da esterase mais elevadas no controle e maior produção de lipídeos no efluente. Os dados mostram ser possível a utilização desses efluentes no cultivo de microalgas importantes à produção de biodiesel com reduções efetivas dos nutrientes presentes na água residual e que, dependendo da espécie, os efluentes podem oferecer condições favoráveis a uma maior produção de lipídeos. Contudo, os cultivos de microalgas nesses efluentes podem ter duplo interesse: minimizar impactos ambientais e produzir biomassa microalgal que pode ser usada para produção de biodiesel ou outros coprodutos de interesse à biotecnologia, reduzindo assim os custos de produção em cultivos em massa.

**Palavras-chave:** ácidos graxos, citometria de fluxo, fisiologia celular, meio alternativo.

## ABSTRACT

Microalgae have been the focus of great interest for the biofuels production due to its enormous capacity to produce biomass, and because many species produce fatty acids in amounts many times the various oleaginous plants. Many microalgae also act as efficient bioremediators domestic and industrial residues, so integrated cultivation of promising microalgae for biofuels coupled to wastewater treatment systems can provide several benefits including cost reductions in effluents treatment and biomass microalgal production, cheapening the culture, promoting nutrient removal and minimizing environmental impacts. This research aimed to evaluate the effectiveness of regional microalgae act in the bioremediation of three types of effluents: biodiesel washing water, shrimp wastewater and agricultural drainage water using potentially promising species for the production of biodiesel that can grow in these effluents as a culture medium . Were used 12 isolated species of microalgae various aquatic environments in northeastern Brazil with 11 freshwater and 1 marine. The selection of species was made considering those which produce substantial amounts of fatty acids, with some even superior to soy. The experiments were performed in chambre culture ( $25 \pm 1$  ° C, photoperiod of 12h) in balloons 6L capacity with continuous aeration. The growth of the species under the conditions tested was accompanied by cell counts and measurement of fluorescence in vivo and the physiological responses by flow cytometry. In the effluent were determined  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{PO}_4$ , pH, COD, turbidity, electrical conductivity and total solids using analytical procedures and/or multiparameter probe. In biodiesel washing water 11 species were tested, only two of which showed good growth. Of these, *Monoraphidium contortum* was selected for the bioremediation tests due to its higher capacity for growth and be the second species with a higher content of fatty acids. It was found that the species reduces the concentration of  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , and COD in percentages of 25.8%, 7.2% and 31.2%, respectively. In shrimp farming water the genus *Amphora* sp. it showed considerable growth, but lower than the control, but with higher production lipids. Removal  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  and  $\text{NO}_2$  in this species in this effluent was 73.357%, 72.572% and 66.667%, respectively. In agricultural drainage water were tested of which 11 species. *Monoraphidium contortum* was selected for the bioremediation test and biomass production and yield of the final number of cells in this experimental condition were lower than the control. In this kind effluent removed approximately 73% and 100% for respectively  $\text{NO}_3$  and  $\text{PO}_4$ . Comparisons of physiological responses showed cell concentrations, florescence chlorophyll and activity of higher esterase in control and increased production of lipids in the drainage water The data show it is possible to use these effluents in the cultivation of microalgae important for biodiesel production with effective reduction of nutrients present in wastewater and that, depending on the species, the effluent may offer favorable conditions for increased production of lipids. However, microalgal cultures in these effluents can be double interest: to minimize environmental impact and producing microalgal biomass that can be used to produce biodiesel, or other byproducts of interest to the biotechnology, thereby reducing production costs in mass culture.

**Keywords:** fatty acids, flow cytometer, cell physiology, alternative medium.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 4.1.</b> Teores de ésteres nas 11 espécies de microalgas selecionadas comparados com a soja.....	42
<b>Figura 4.2.</b> Curvas de crescimento das espécies testadas no cultivo com água de lavagem de biodiesel previamente tratada.....	43
<b>Figura 4.3.</b> Rendimento celular ( $n^{\circ}$ células.mL <sup>-1</sup> .10 <sup>4</sup> ) e rendimento em biomassa (g L <sup>-1</sup> ) das 11 espécies de microalgas cultivadas em água de lavagem de biodiesel.....	44
<b>Figuras 4.4.</b> Crescimento da cepa D173WC em meio controle e em água de lavagem de biodiesel com concentração de 75%.....	45
<b>Figura 5.1.</b> Curvas de crescimento da espécie <i>Amphora</i> sp. em meio padrão (Conway) e em água de carcinicultura a 100% em 21 dias de cultivo.....	64
<b>Figura 5.2.</b> Comparação da curva de lipídeos da diatomácea <i>Amphora</i> sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivo (* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC 100% = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.....	65
<b>Figura 5.3.</b> Curvas da concentração celular da diatomácea <i>Amphora</i> sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivo (* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC 100% = Água de camarão a 100%.....	66
<b>Figura 5.4.</b> Comparação do tamanho celular (FSC) da diatomácea <i>Amphora</i> sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivos. (* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.....	67
<b>Figura 5.5.</b> Comparação do tamanho celular (FSC) da diatomácea <i>Amphora</i> sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivos. (* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado).....	68
<b>Figura 5.6.</b> Complexidade celular (SSC) da diatomácea <i>Amphora</i> sp entre o cultivo no meio controle (Conway) e na água de camarão a 100% em 21 dias. (* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nos tempos indicados). AC = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.....	68
<b>Figura 6.1.</b> Curvas de crescimento de 11 espécies de microalgas testadas em água de drenagem agrícola.....	86

- Figura 6.2.** Curva de crescimento da microalga *Monoraphidium contortum* em duas condições (meio controle e água de drenagem agrícola) e rendimento máximo da espécie para cada tratamento. C= controle; ADA= água de drenagem agrícola..... 87
- Figura 6.3.** Síntese de células lipídicas da microalga *Monoraphidium contortum* marcadas com marcador fluorescente Bodipy nas duas condições, controle (meio WC) e 100%.ADA (água de drenagem agrícola) testadas e nas diferentes fases de cultivo. As letras mostram diferença entre os tempos em cada condição e o asterisco mostra diferença entre as condições no tempo indicado (UA= Unidade arbitrária)..... 89
- Figura 6.4.** Fotografias de *Monoraphidium contortum* marcados com Bodipy para visualização de células lipídicas da microalga no microscópio de fluorescência em contraste de fase (a) e campo escuro (b, c) com aumento de 1000x..... 90
- Figura 6.5.** Concentração bacteriana nas duas condições de cultivo, controle (meio WC) e 100%.ADA (água de drenagem agrícola) da microalga *Monoraphidium contortum*. As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado..... 91
- Figura 6.6.** Fotografia em microscópio de fluorescência de células bacterianas marcadas com Sybrgreen (em verde) e de células de *Monoraphidium contortum* evidenciadas na coloração vermelha devido a autofluorescência da clorofila, em aumento de 1000x..... 92
- Figura 6.7.** Fluorescência da clorofila da *Monoraphidium contortum* nas três fases de cultivo em meio WC (Controle) e em água de drenagem agrícola (ADA). As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado. (UA= Unidade arbitrária)..... 93
- Figura 6.8.** Atividade esterase evidenciada na citometria de fluxo através da marcação com FDA em *Monoraphidium contortum* nas três fases de cultivo em meio WC (Controle) e em água de drenagem agrícola. As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado. (UA= Unidade arbitrária)..... 94
- Figura 6.9.** Comparação do percentual de células vivas que foram marcadas com FDA na microalga *Monoraphidium contortum* nas duas condições de cultivo testadas, controle (meio WC) e 100% ADA (água de drenagem agrícola). As letras distintas mostram diferença entre os tempos em cada tratamento..... 95
- Figura 6.10.** Comparação do percentual de células vivas que foram marcadas

com FDA na microalga *Monoraphidium contortum* nas duas condições de cultivo testadas, controle (meio WC) e 100% ADA (água de drenagem agrícola). As letras distintas mostram diferença entre os tempos em cada tratamento.....

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 4.1.</b> Espécies de microalgas selecionadas para a determinação do teor de ácidos graxos.....	39
<b>Tabela 4.2.</b> Características físicas e químicas do efluente líquido da usina de biodiesel.....	41
<b>Tabela 4.3.</b> Perfil de ácidos graxos em biomassa seca de <i>Monoraphidium contortum</i> .....	44
<b>Tabela 4.4.</b> Porcentagem de remoção de nitrato, fosfato e DQO pela microalga <i>Monoraphidium</i> sp. em duas condições de cultivo.....	46
<b>Tabela 5.1.</b> Parâmetros físico-químicos analisados na água de carcinicultura.....	62
<b>Tabela 5.2.</b> Valores brutos e porcentagem de remoção de fosfato, nitrato e nitrito do efluente de carcinicultura ao longo dos dias de cultivo.....	63
<b>Tabela 6.1.</b> Espécies de microalgas utilizadas nas análises de ácidos graxos e cujo crescimento foi testado em água de drenagem agrícola na concentração de 100%.....	81
<b>Tabela 6.2.</b> Valor de pH e concentração de Fosfato e Nitrato em água de drenagem agrícola bruta.....	84
<b>Tabela 6.3.</b> Percentual de remoção do nitrato (NO <sub>3</sub> ) no meio padrão (controle) e na água de drenagem agrícola (ADA) ao longo do cultivo da microalga <i>Monoraphidium contortum</i> .....	88
<b>Tabela 6.4.</b> Percentual de remoção do fosfato (PO <sub>4</sub> ) no meio padrão (controle) e na água de drenagem agrícola (ADA) ao longo do cultivo da microalga <i>Monoraphidium contortum</i> .....	88

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ADA - Água de Drenagem Agrícola

AESA – Agência Executiva de Gestão das águas do Estado da Paraíba

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

ANP - Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

APHA - American Public Health Association

B100 - Biodiesel puro

B7 - 7% do biodiesel no diesel

BODIPY - Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N

DDT - Diclorodifeniltricloroetano

DQO - Demanda Química de Oxigênio

FAME - Fatty Acids Methyl Ester

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA - Diacetato de fluoresceína

FSC - Forward Scatter (tama

MEA - Millenium Ecosystem Assessment

PAC - Programa de Aceleração do Crescimento

rRNA - RNA ribossomal

SSC - Side Scatter (Complexidade celular)

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
3.1 CULTIVO DE MICROALGAS.....	19
3.2 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS.....	22
3.3 BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES E MICROALGAS.....	27
<b>4 ARTIGO: EFETIVIDADE DO USO DE MICROALGAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL</b> .....	32
<b>RESUMO</b> .....	33
<b>ABSTRACT</b> .....	34
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.2.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL.....	38
4.2.2 ANÁLISES DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM MICROALGAS PRÉ-SELECIONADAS.....	38
4.2.3 CULTIVOS DE MICROALGAS EM ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL PREVIAMENTE TRATADA.....	39
4.2.4 ESTATÍSTICA.....	40
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.3.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL UTILIZADA.....	41
4.3.2 TOTAIS DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS ESTUDADAS.....	41
4.3.3 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS SELECIONADAS EM ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL.....	42
4.3.4 CULTIVO DE <i>Monoraphidium contortum</i> (CEPA D173WC) EM ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL.....	44
4.3.5 REMOÇÃO DE NUTRIENTES E DQO DA ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL POR <i>Monoraphidium contortum</i> .....	46
<b>4.4 CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>5 ARTIGO: APROVEITAMENTO DE EFLUENTES DE CARCINICULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS COM POTENCIAL USO EM BIOTECNOLOGIA</b> .....	53
<b>RESUMO</b> .....	54
<b>ABSTRACT</b> .....	55
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	56

<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	60
5.2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO EFLUENTE DE CARCINICULTURA.....	60
5.2.2 POTENCIAL DE CRESCIMENTO DA DIATOMÁCEA MARINHA <i>Amphora</i> sp EM ÁGUA DE CARCINICULTURA E EFETIVIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....	60
5.2.3 MEDIDAS DE FISIOLOGIA CELULAR E METABOLISMO LIPÍDICO DE <i>AMPHORA</i> SP NO FRASCO CONTROLE E EM ÁGUA DE CARCINICULTURA.....	61
5.2.4 ESTATÍSTICA.....	61
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
5.3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO EFLUENTE DE CARCINICULTURA.....	62
5.3.2 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>Amphora</i> sp. EM MEIO CONWAY E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....	62
5.3.3 FISIOLOGIA CELULAR DE <i>AMPHORA</i> SP. DURANTE O CULTIVO EM ÁGUA DE CARCINICULTURA.....	65
<b>5.4 CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>6 ARTIGO: POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE <i>Monoraphidium contortum</i> E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA</b> .....	74
<b>RESUMO</b> .....	75
<b>ABSTRACT</b> .....	76
<b>6.1 INTRODUÇÃO</b> .....	77
<b>6.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	80
6.2.1 COLETA DE ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA, PROCEDIMENTO DE CLAREAMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS.....	80
6.2.2 SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE MICROALGAS E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA.....	80
6.2.3 CULTIVO DE <i>Monoraphidium contortum</i> EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA E REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....	81
6.2.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABOLISMO LIPÍDICO DE <i>Monoraphidium contortum</i> CULTIVADA EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA NA CONCENTRAÇÃO DE 100%.....	81
6.2.4 ESTATÍSTICA.....	82
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	84
6.3.1 ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA.....	84
6.3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO DAS 11 ESPÉCIES DE MICROALGAS EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA.....	85
6.3.3 CRESCIMENTO DE <i>Monoraphidium contortum</i> EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES.....	87
6.3.4 METABOLISMO LIPÍDICO E FISIOLOGIA CELULAR.....	89
<b>6.4 CONCLUSÕES</b> .....	97
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	98
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	105

<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>108</b>
--------------------------------	------------

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A preocupação com as questões ambientais tem se mostrado cada vez mais evidente devido à demasiada utilização de recursos naturais em diversos processos produtivos, resultando em elevados níveis de impactos ambientais (BARCELLOS, OLIVEIRA; CARVALHO, 2009). Nos dias de hoje, há uma crescente demanda por produtos e serviços, aumentando drasticamente a atividade industrial, elevando, dessa forma, a geração de resíduos, e a utilização de recursos naturais os quais estão se tornando cada vez mais escassos e potencialmente degradados (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

A partir desta problemática, busca-se atrelar medidas práticas de proteção ambiental ao desenvolvimento econômico, desenvolvendo técnicas e alternativas efetivas para minimizar o efeito dos impactos ambientais. Uma das alternativas consiste em utilizar processos biológicos que possuem possibilidades de aplicações ambientais e comerciais, a exemplo da utilização de microalgas em estudos de tratamento de efluentes (MEZZOMO et al., 2010), sequestro de carbono (WANG et al., 2008), biorremediação e controle de poluição (SIVA KIRAN et al., 2012), produção de energia (VARFOLOMEEV; WASSERMAN, 2011), e indústrias alimentícia (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013) e farmacêutica (AHMED et al., 2014).

A importância das microalgas para a biotecnologia destaca-se entre os modernos processos microbiológicos com frentes de pesquisa desenvolvidos nas últimas décadas (NAGARAJAN; MARUTHANAYAGAM; SUNDARARAMAN, 2012). A utilização das microalgas na produção de energia tem sido cada vez mais investigada, podendo-se admitir que a energia do futuro que possa atender grande parte das atividades humanas deverá ser dependente do cultivo e processamento das microalgas (GONG; JIANG, 2011; MENG et al., 2009; MONTERO; ARISTIZÁBA; REINA, 2011; TEIXEIRA; MORALES, 2007).

As microalgas são versáteis com relação à produção de tipos de biocombustíveis, como o biodiesel, o bioetanol, biogás, bioquerosene e Bio-hidrogênio e ultimamente a maioria das pesquisas têm sido orientadas ao desenvolvimento de métodos de cultivo e engenharia de sistemas de cultivo, engenharia genética e metabólica, a fim de aumentar a produção lipídica, medidas eficientes de colheita de biomassa, tecnologias de conversão de biocombustíveis, avaliação de custo-eficácia, avaliação do ciclo de vida e implicações políticas (GHOSH et al., 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2016; SAWAENGSAK et al., 2014; TERCERO; DOMENICALI; BERTUCCO, 2014; ZHU, 2015).

O cultivo de microalgas consiste num sistema biológico muito eficiente no armazenamento de energia solar que se dá através da produção de compostos orgânicos pela fotossíntese, sendo que a maioria das espécies apresenta crescimento rápido, possibilitando a produção de grandes volumes de biomassa e necessitando de áreas muito menores se comparadas ao cultivo de plantas terrestres (MAITY et al., 2014). Além disso, esses microrganismos têm grande capacidade de absorção do CO<sub>2</sub> visto que 90% do peso da microalga é proveniente do consumo de CO<sub>2</sub> nos cultivos fotoautotróficos, logo, a produção em larga escala de microalgas reduziria as concentrações de carbono na atmosfera. Segundo Brown e Zeiler (1993), estima-se que cada tonelada de biomassa algal produzida em determinado tempo consome cerca de 2 toneladas de CO<sub>2</sub> pela fotossíntese, valor este que é de 10 a 20 vezes maior do que o absorvido pelas plantas oleaginosas. Muitas microalgas produzem substanciais quantidades de proteínas, lipídeos e carboidratos e a biomassa dos cultivos pode ser utilizada como alimento humano ou animal (ZHU, 2015). Outras microalgas são prolíficas produtoras de ácidos graxos, sendo de extrema importância para a produção de biodiesel (RAWAT et al., 2013). Adicionalmente, as microalgas produzem diversos compostos de interesse farmacológico ou químico, intermediários do setor petroquímico, bioplásticos, e compostos bioativos diversos (CHU et al., 2010; DERNER, 2006; FRANCO et al., 2013), de maneira que o interesse pelo aproveitamento desses organismos em processos produtivos cresce a cada dia.

O cenário dos biocombustíveis tem recebido cada vez mais atenção, não somente por ser uma fonte de energia renovável, mas também porque os biocombustíveis são biodegradáveis e produzem menores quantidades de substâncias poluentes, a exemplo do CO<sub>2</sub> (CHISTI, 2007; COOK; BEYEA, 2000; PEREIRA et al., 2012). No Brasil, os biocombustíveis são derivados principalmente da agricultura e as plantações extensas de espécies vegetais no processo produtivo provocam a fragmentação de ecossistemas reduzindo os habitats naturais de muitas espécies, exaurem a biodiversidade, provocam perda da fertilidade do solo e outros fatores adversos ao meio ambiente. Além disso, o agronegócio baseado na produção de biocombustíveis também é sinônimo de uso abusivo de agrotóxicos e fertilizantes químicos, que trazem riscos adicionais à integridade dos ecossistemas e à saúde pública.

Os biocombustíveis derivados de microalgas têm um retorno energético muito mais elevado do que outros biocombustíveis e atendem simultaneamente tanto aos quesitos ambientais como aos de demanda (GROOM et al., 2008). No entanto, essa produção apresenta elevado custo, sendo 4 a 10 vezes maior do que os combustíveis derivados de petróleo e do biocombustível proveniente de oleaginosas (CHISTI, 2007), principalmente pelos meios de cultura empregados para produzir biomassa que necessitam de diversos produtos químicos,

alguns de preço muito alto. A fim de reduzir os custos de produção, tem sido sugerida a integração do cultivo de microalgas com o tratamento de efluentes para a remoção de compostos inorgânicos que em altas concentrações no ambiente podem causar alterações na dinâmica de determinados ecossistemas. Ainda assim, alguns desses tratamentos necessitam da adição de suplementos nutricionais nos cultivos (CHO et al., 2013). Os efluentes precisam passar por um tratamento seguro antes de serem descartados no ambiente que usualmente inclui um tratamento primário, realizado por processos físico-químicos, secundário, geralmente por meio de reações bioquímicas, além de um tratamento terciário que pode incluir o uso de compostos químicos (OSUNDEKO; PITTMAN, 2014).

Assim, o cultivo de microalgas em águas residuais tem-se mostrado bastante promissor devido à alta eficiência de remoção de nutrientes desses organismos, além da produtividade de biomassa usualmente elevada (ZHU et al., 2013). A capacidade de transformar materiais poluentes em biomassa de elevado valor econômico ou energético torna as microalgas importantes agentes mitigadores de impactos ambientais, devido à enorme capacidade que elas têm de retirar nutrientes do meio e absorver gás-carbônico.

A dissertação encontra-se subdividida em seis capítulos, os três primeiros com uma introdução geral, objetivos e referencial teórico e os três últimos apresentando, em cada um deles, artigos que foram desenvolvidos neste trabalho, a serem submetidos para revistas científicas.

O primeiro artigo, refere-se a capacidade de biorremediação de água de lavagem de biodiesel com microalgas que possam ter interesse à produção de biodiesel. Neste contexto foi testada a capacidade de crescimento de 11 linhagens de microalgas, das quais 3 apresentam ácidos graxos superiores à soja, selecionando-se uma das espécies que apresenta os melhores desempenhos nesse tipo de efluente a fim de avaliar seu crescimento e sua capacidade de biorremediação desse efluente, em termos de remoção de nitrato e fosfato.

O segundo artigo, teve o propósito de avaliar a capacidade de biorremediação de efluente de carcinicultura com a microalga *Amphora* sp. que apresenta quantidades de ácidos graxos superiores à soja. Avaliou-se sua capacidade de crescimento e sua capacidade de biorremediação nesse efluente, em termos de remoção de nitrato, nitrito e fosfato e foi avaliado a produção de lipídeos através da citometria de fluxo.

No terceiro artigo avaliou-se a capacidade de biorremediação de água de drenagem agrícola com microalgas que podem ter interesse à produção de compostos lipídicos testando-se a capacidade de crescimento de 11 cepas regionais de microalgas, das quais 3 apresentam quantidades de ácidos graxos superiores à soja e selecionando-se uma das espécies que

apresenta os melhores desempenhos dentre as que foram testadas, para avaliar sua capacidade de crescimento nesse tipo de efluente e sua capacidade de biorremediação, em termos de remoção de nitrato e fosfato e produção de lipídeos através da citometria de fluxo.

## **CAPÍTULO 2**

### **OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a efetividade de utilização de microalgas regionais na bioremediação de diferentes tipos de efluentes líquidos oriundos de atividades humanas, com o propósito de mitigar os impactos ambientais dessas atividades, e produzir biomassa algal de espécies potencialmente promissoras à produção de biodiesel usando esses efluentes como meio de cultura alternativo.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Avaliar a efetividade do uso de microalgas na biorremediação de água de lavagem de biodiesel visando o aproveitamento desses resíduos como meio alternativo para a produção de biomassa de espécies potencialmente importantes à produção de biodiesel;
- b) avaliar a efetividade do uso de microalgas na biorremediação de efluente de carcinicultura visando o aproveitamento desses resíduos como meio alternativo para a produção de biomassa de espécies potencialmente importantes à produção de biodiesel;
- c) avaliar a efetividade do uso de microalgas na biorremediação de água de drenagem agrícola visando o aproveitamento desses resíduos como meio alternativo para a produção de biomassa de espécies potencialmente importantes à produção de biodiesel.

## **CAPÍTULO 3**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Os cultivos intensivos de microalgas representam hoje um dos mais modernos processos da biotecnologia. A partir desses cultivos é possível obter-se alimento e vários produtos de interesse nutricional, farmacológico e industrial, a custos muito inferiores do que aqueles empregados pela agricultura tradicional, e numa velocidade de produção muito mais rápida (CHISTI, 2007).

Historicamente o primeiro registro acerca do cultivo de microalgas deve-se ao alemão Ferdinand Cohn em 1850, que manteve viva, em seu laboratório, uma clorofícea flagelada de água doce, pertencente ao gênero *Haematococcus*. No entanto, os primeiros estudos experimentais abordando aspectos do cultivo de microalgas devem-se a Famintzin em 1871, e o primeiro cultivo monoespecífico de *Chlorella vulgaris* (clorofícea) foi obtido por Beijerinck em 1890 (MARTINS, 2014). Os primeiros estudos fisiológicos empregando culturas de microalgas foram realizados por Warburg por volta de 1900. Mas foi somente por volta de 1950 que os cultivos em massa desses organismos começaram a receber mais atenção. O livro clássico de Burlew (1953) procurou sumarizar o conhecimento a respeito na época e a partir de então o interesse nos cultivos de microalgas tem aumentado continuamente.

Nos últimos 45 anos muitos estudos básicos com microalgas em culturas foram desenvolvidos. Esses estudos têm focado diversos aspectos, como efeitos das condições fóticas sobre os cultivos (FAWLEY, 1984; GRIFFITHS, 1973; MAREC, 2015; QURASHI; SPENCER, 1971; SAVIDGE, 1986); temperatura (EVENS; NIEDZ; KIRKPATRICK, 2008; FAN; VONSHAK; BOUSSIBA, 1994; MORRIS; CLOVER, 1974, RAIMBAULT, 1984; 1986), salinidade (BLINN, 1984; BRAND, 1984, MOHAN; DEVI, 2014; SHIMURA; SHIBUYA; ICHIMURA 1979; SCHOBERT, 1980), absorção de compostos nitrogenados (CAPORGNO et al., 2016, CHI et al., 2016; CRESSWELL; SYRETT, 1979; RAIMBAULT, 1984), genética molecular (GOSH et al., 2016; SHAH; SYRETT, 1982), aminoácidos (FLYNN; SYRETT, 1985, 1986a,b; RAMOS-SUAREZ et al., 2014; ZHANG; ZHANG; SHAOHUA, 2014), aquicultura (BEM-AMOTZ et al., 1987; GENG et al., 2016; OKAUCHI; HIRANO, 1986; SCOTT; BAYNES, 1978; SIMON, 1978; TAELEMAN et al., 2013; WALNE, 1970; WALSH et al., 1987), composição química, objetivando-se a alimentação de animais em cativeiro (BROWN, 1991; BROWN et al., 1997, 1998; CAERS et al., 1999; KWAN et al., 2015; LOPES-MUÑOZ; ABALDE; HERERRO, 1992; O'CONNOR; NELL; DIEMAR, 1992;

SOUTHGATE et al., 1998; WHYTE, 1987), constituição química das microalgas em diferentes condições de cultivos (OJEDA; AFONSO, 1986; ANTIA, 1977; FABREGAS et al., 1984, 1985, 1987; FIDALGO et al., 1998; GOLDMAN, 1980; LOURENÇO et al., 1997; MARKOU; NERANTZIS, 2013; NELSON et al., 1992; SUKENIK; YAMAGUCHI; LIVNE, 1993; SAUODIS-HELIS et al., 1999; VALENZUELA-ESPINOZA; MILLÁN; NÚNEZ, 2002) e outros estudos ecológicos diversos envolvendo relações interespecíficas como competição (GOLDMAN; RYTHER; DENNET, 1982; RIJSTENBIL, 1988), alelopatia (MA et al., 2015; SHARP; UNDERHIL; HUGHES, 1979; ZAK; MUSIEWICZ, KOSAKOWSKA, 2012) e recentemente estudos sobre análises de ciclo de vida (AJAYEEBI; GNANSOUNOU; RAMAN, 2013; GNANSOUNOU; RAMAN, 2016).

A literatura que trata dos estudos sobre cultivos de microalgas é muito vasta, demonstrando que o tema vem de longo tempo recebendo a atenção de pesquisadores no mundo todo. Outras abordagens que têm sido conduzidas com esses organismos incluem estudos sobre fotossíntese, bioensaios de toxicidade e de enriquecimento, visando determinar compostos nutricionais limitantes, tolerância de espécies à dessecação e escuridão de células vegetativas e esporos de resistência, excreção e absorção de compostos (ABU-GOSH et al., 2015, CHI et al., 2016; CLEVELAND; PERRY, 1987; HARGRAVES; FRENCH, 1975; LOMBARDI, 1990; MARKAGER; VICENT; TANG, 1999; MARKOU; NERANTZIS, 2013; NAKANISHI; MONSI, 1965; QUARMBY, TURPIN; HARRISON, 1982; RAIMBAULT, 1984).

No Brasil, a maior parte das pesquisas sobre este tema entre as décadas de 1970-2000 tinha-se restringido a estudos laboratoriais em condições controladas, principalmente sobre aspectos metodológicos (VIEIRA, 1975, 1977), ecológicos e ecofisiológicos (YONESHIGUE BRAGA, 1971; TEIXEIRA; VIEIRA, 1975; VIEIRA, 1976; VIEIRA, 1980; AIDAR-ARAGÃO, 1980; AIDAR-ARAGÃO; TEIXEIRA; VIEIRA, 1980, GAETA, 1985; TEIXEIRA et al., 1986, SIGAUD, 1990), meios alternativos (CASTRO, 1979; GONZALEZ-RODRIGUEZ; MAESTRINI, 1983; LOURENÇO et al., 1997; MELO; SASSI; ARAÚJO, 1993; OLIVEIRA; KOENING, 1984, TRIANI; SEIXAS-FILHO; COSTA 1984; TRIANI; SEIXAS-FILHO; RODRIGUES, 1986) e análises bioquímicas (TALAMONI; SILVA; CÁCERES, 1988; KOENING; MAIA; CAMPOS-TAKAKI, 1990, LOURENÇO et al., 1997). Hoje o foco das pesquisas sobre microalgas no Brasil, gira em torno da investigação de espécies potenciais para bioenergia, biorefinaria de coprodutos, alternativas econômicas para a produção de biocombustíveis, biorremediação com relação ao tratamento de águas residuais, lipídios, redução dos custos nos cultivos, produção e obtenção de biomassa, engenharia genética

(CABANELAS et al., 2013; COSTA; MORAIS, 2011; KLIGERMAN; BOUWER, 2015; NASCIMENTO et al., 2013; SILVA et al., 2014; SPERANZA; INGRAM; LEEKE, 2015).

No processo de isolamento e manutenção dos cultivos monoespecíficos de microalgas facilmente ocorre contaminação do material por outros seres microscópicos, sejam fotossintéticos ou não. Para isso, algumas pesquisas são desenvolvidas com o intuito de descobrir novas alternativas para a obtenção de uma linhagem unialgal e axênica, incluindo o uso de antibióticos (TANG et al., 2010), porém a utilização dessa substância pode causar danos celulares a microalga e interferir na absorção de certos nutrientes como a vitamina B12, por isso muitas vezes não há sucesso na obtenção de uma cultura axênica (LEVY et al., 2009, AMARAL et al., 2013).

Desde que várias espécies podem conter mais de 50% de proteína (BECKER, 1995) o aproveitamento mais promissor das microalgas, ainda, é a produção de alimento. Porém as microalgas também têm importância ambiental muito grande, uma vez que podem ser utilizadas no controle da qualidade da água, particularmente na remoção de compostos tóxicos, incluindo amônia ( $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2$ ), em diversos tipos de efluentes (VÍLCHEZ et al., 1997; CHUNTAPA; POWTONGSOOK, 2003, KANG; WEN, 2015) e na remoção de compostos nutricionais como nitrato (CAPORGNO et al., 2015) e fosfato (LANANAN et al., 2014) em estações de tratamento de água. Nesses casos a biomassa algácea aumenta consideravelmente levando a depleção de oxigênio, sendo necessária sua remoção frequente (VÍLCHEZ; VEGA, 1994; KAYA et al., 1995).

A utilização das microalgas na produção de energia também tem sido cada vez mais investigada. Em condições de cultivo as microalgas são muito susceptíveis às variações físicas e químicas da luz, salinidade, temperatura e nutrientes (BOOMIATHAN, 2005; SEMYALO, 2009; CHOKSHI et al., 2015, ZIENKIEWICS et al., 2016), sendo o crescimento influenciado por esses fatores. Desde que os requerimentos para o sucesso dos cultivos das microalgas variam de espécie para espécie (VAN BAALEN, 1967) pode ser necessário fazer algumas modificações no meio e nas condições de cultivo (ALLEN; STAINER, 1968; ALLEN; ARNON, 1955; MARKOU; NERANTZIS, 2013; RIPPKA et al., 1979) e realizar estudos da fisiologia e metabolismo celular em culturas puras para o sucesso em aplicações tecnológicas em cultivos em massa (ZIENKIEWICS et al., 2016).

### 3.2 O POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS MICROALGAS

O interesse pelas microalgas tem crescido profusamente nas últimas décadas, a notar pelo volume de publicações sobre esses organismos e pela quantidade de informações divulgadas na *internet*, quer seja em termos de documentação científica e educacional, divulgações de eventos científicos, usos econômicos, perigos à saúde pública e ambiental, e aplicações industriais.

No Google, em abril de 2016, são listadas 361.000 páginas sobre o termo “microalgae” que cobrem uma grande diversidade de assuntos, colocando à disposição dos usuários da rede mundial de computadores o que existe de mais atual a respeito. Dentre os assuntos de buscas mais relacionados destacam-se biotecnologia, fotobiorreatores, biodiesel, óleos de microalgas, bioetanol e fazendas de microalgas. Inúmeras outras páginas relacionadas são também referidas, evidenciando que este assunto penetra em diversas áreas de interesse. O tema “microalgae farms” fornece aproximadamente 171.000 citações pelo Google; o termo “microalgae biodiesel” nos dá aproximadamente 357.000 resultados, o termo “microalgae taxonomy” nos dá aproximadamente 235.000 resultados e o termo “microalgae energy” nos dá 523.000 resultados. Até mesmo em temas bastante exóticos, como “microalgae and planetary colonization”, encontraremos cerca de 2.240.000 resultados de busca e “microalgae and spatial sciences” 12.100.000 resultados de busca. Uma rápida busca do termo “microalgae Brazil” forneceu 196.000 resultados de busca, indicando que o interesse no assunto tem crescido profusamente inclusive no Brasil. O interesse aplicado desses microrganismos relaciona assuntos dos mais variados possíveis, que incluem desde a produção de hidrogênio, engenharia ambiental, fotobiologia, bioenergética molecular, bioinformática, pesquisas pós genômicas, engenharia genética, dentre tantas outras frentes de ponta.

Por trás desse interesse estão as múltiplas possibilidades do uso biotecnológico das microalgas. Só a indústria de alimentos e produção de fármacos mostram um potencial de crescimento inesgotável. Alimentos, cosméticos e corantes extraídos das microalgas deverão contribuir com grande parcela das necessidades nas sociedades futuras e as pesquisas sobre produção de energia a partir de microalgas apontam para possibilidades ainda mais relevantes.

Todas essas possibilidades têm alavancado pesquisas básicas e aplicadas e estimulado investimentos sobre o tema no mundo todo. No Brasil, a maioria dos trabalhos publicados com microalgas no período de 1980 a 2012 é de natureza taxonômica, muito embora várias regiões do país ainda permaneçam muito pouco conhecidas a este respeito. A necessidade de mais estudos taxonômicos e sobre outras abordagens torna-se assim imperativo num país de dimensões continentais como o Brasil e detentor do mérito de ser um dos principais *hot spots* da biodiversidade do planeta. Nesta conjuntura, trabalhos sobre bioprospecção de microalgas

são essenciais para a exploração de novas espécies dentre as existentes na natureza, por permitirem isolar, purificar e posteriormente estabelecer um conjunto de possíveis aplicações biotecnológicas.

Alguns grupos, como as cianobactérias marinhas, por exemplo, produzem uma grande diversidade de compostos importantes tanto para a indústria farmacêutica como a indústria alimentícia. Elas podem produzir metabólitos secundários bioativos (CARMICHAEL, 2001; CODD, 1997; GERWICK et al., 2001; TAN, 2007), que têm elevada importância biotecnológica, pois podem ser importantes fontes de agentes farmacêuticos como vitaminas (TAN; GOH, 2009) e substâncias antimitóticas e antimicrobianas, a exemplo da apratoxina A (LUESCH et al., 2001), azol (TAORI et al., 2008) e hantupeptina A (TRIPATHI et al., 2009), que são reconhecidas como drogas antitumorais. Muitas espécies de cianobactérias podem fixar nitrogênio e assim desempenham um importante papel no balanço global de nitrogênio nos oceanos (CARPENTER; ROMANS, 1991), além do que diversas espécies são relevantes para a agricultura (VAISHAMPAYAN et al., 2001), enquanto que muitas outras tem sido uma grande promessa para propósitos de biorremediação (GONÇALVES et al., 2016, MALINUEVO et al., 2016, PRIYA et al., 2014).

Ressalta-se a importância da cianobactéria *Spirulina*, uma das algas mais antigas da Terra com cerca de 3,0 bilhões de anos (YANG et al., 1997), e uma das mais cultivadas no mundo para vários propósitos, incluindo alimentação humana e produção de inúmeros compostos bioativos. Sua biomassa seca é um valioso suplemento alimentar (BELAY et al., 1993; CIFELLI, 1983), com baixas concentrações de ácidos nucleicos e aminoácidos, similares às recomendações da FAO (CIFERI; TIBONI, 1985; RICHMOND, 1988), sendo a *Spirulina* é rica em proteínas (60–70% em peso), vitaminas (especialmente B12 e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno), e minerais como o ferro (BELAY, 2002; FAO, 2008). Além disso, a *Spirulina* contém ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) importantes para a saúde, sendo uma fonte importante de ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA) e pigmentos antioxidantes como os carotenoides, porém não são adequados para a produção de biodiesel (BELAY et al., 1996; BELAY, 2002).

Na área de energias, algumas espécies de microalgas se destacam por produzirem elevadas concentrações de óleo que podem chegar até 75% em peso em relação à biomassa seca, a exemplo da clorofícea *Botryococcus braunii* (MATA et al., 2009). A soja, uma das plantas oleaginosas muito utilizada na produção de energia, contém cerca de 18% de óleo no grão. Algumas espécies de microalgas que produzem quantidades de óleo próximo ou superior à soja, incluem *Scenedesmus obliquus* (12-14%), *Euglena gracilis* (14-20%), *Scenedesmus dimorphus* (16-40%), *Prymnesium parvum* (22-38%), *Chlamydomonas reinhardtii* (21%),

*Chlorella vulgaris* (14-22%), *Spirogyra* sp. (11-21%), e *Dunaliella tertiolecta* (64-71%) (TEIXEIRA; MORALES, 2007).

A produção de biomassa a partir de microalgas pode atingir cerca de 15-25 toneladas/ha/ano e a estimativa para a produção de lipídios é em torno 4,5-7,5 toneladas/ha/ano. Em comparação com as oleaginosas geralmente utilizadas nesse processo, claramente vê-se um potencial na produção de biodiesel a partir de microalgas, uma vez que a soja produz 0,4 tonelada/ha/ano, a palma 3,62 toneladas/ha/ano, e o pinhão manso 4,14 toneladas/ha/ano (CHISTI, 2007; LAM; LEE, 2011, 2012). Usualmente os cultivos em massa de microalgas podem ser efetuados em tanques abertos (*raceways*) ou em sistemas fechados e controlados (fotobiorreatores) de diferentes concepções, sendo que estes últimos apresentam maiores produtividades e estão isentos de possíveis contaminações.

Chisti (2008), entretanto, ressalta que o conteúdo de óleo nas microalgas pode exceder 80% da biomassa seca, contrastando com muitas plantas oleaginosas utilizadas para produzir biodiesel que contém uma quantidade de óleo muito reduzida quando comparada às microalgas, sendo, portanto, a produção atual de biodiesel desses vegetais insuficiente para atender à demanda. Chisti (2007) afirma que a produção de óleo de palma é de apenas 5.950 L.ha<sup>-1</sup> e que somente os Estados Unidos necessitam de aproximadamente 0,53 bilhões de m<sup>3</sup> de biodiesel anualmente, considerando a taxa de consumo de 2007 se todo o sistema de transporte dependente do petróleo fosse substituído pelo biodiesel. Isso significa que seria necessária uma área de 111 milhões de hectares de plantações de palma, o que equivaleria aproximadamente a 61% de toda a área plantada dos USA para produção de alimentos, forragens e outras culturas, evidenciando um cenário irreal. Somente no ano de 2010, o consumo de diesel nos USA atingiu a cifra de 220 bilhões de m<sup>3</sup> e para suprir esta demanda apenas com biodiesel a partir de óleo de soja, seriam necessários 367 milhões de hectares, o que se mostra irreal visto que apenas 178 milhões de hectares estavam disponíveis (LEITE; ABDELAZIZ; HALLENBECK, 2013, KARGBO, 2010).

O uso de biodiesel a partir de microalgas poderia mudar esse cenário, especialmente na zona tropical, onde seria possível produzir 1.535 kg.m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> de biomassa de microalgas, a qual forneceria um conteúdo médio de óleo de 30% da biomassa seca (CHISTI, 2007). As microalgas emergem, portanto, como uma importante fonte de biodiesel de terceira geração, podendo ser cultivadas em altas taxas usando meios alternativos, incluindo efluentes domésticos, não competindo, portanto, com terras disponíveis para a agricultura (ROBERTS et al., 2013).

Por serem organismos fotossintetizantes, esses dados evidenciam que as microalgas têm uma habilidade de fixar CO<sub>2</sub> da atmosfera muito maior do que as plantas terrestres, e muitas espécies produzem mais que 50% de sua biomassa em lipídios, a maior parte na forma de triacilglicerídeos (CHISTI, 2007; HU et al., 2008; PIENKOS; DARZINS, 2009). Além disso, o conteúdo energético das microalgas é de aproximadamente 35.800 kJ.kg<sup>-1</sup>, representando este valor cerca de 80% do conteúdo energético do petróleo (CHISTI, 2013).

Entretanto, inúmeros gargalos ainda precisam ser superados para tornar a produção de biodiesel a partir das microalgas uma atividade economicamente viável. E as pesquisas atuais avançam neste sentido. Um ponto chave é que o conteúdo de lipídios varia tanto quantitativamente como qualitativamente, dependendo das condições de cultivo (CHISTI, 2007). Em condições de cultivo com deprivação de nutrientes (especialmente nitrogênio), pode-se aumentar a síntese de lipídios, mas usualmente isso implica em redução da produtividade em biomassa (PIENKOS; DARZINS, 2009).

Outro fator, restritivo, diz respeito à fase de coleta da biomassa que apresenta um elevado custo devido a questões operacionais. A fase de colheita das microalgas é responsável por uma parte significativa do consumo de energia, que pode ser responsável por 20-30% do custo total de produção (REDDY et al., 2014). Os gastos com energia são elevados, especialmente se processos de centrifugação forem utilizados, mas isso pode ser minimizado se a colheita se der por decantação associada ou não com a floculação. Entretanto, o uso de floculantes químicos como sulfato de alumínio não é recomendado, devido à enorme capacidade oxidativa dos metais, que interferem na estabilidade do biodiesel produzido. Outro aspecto relaciona-se à eficiência limitada do sistema de produção visto que, segundo Pienkos e Darzins (2009), uma produção de microalgas de cerca de 1 g.L<sup>-1</sup> de biomassa necessitaria de 1.000 L de água para produzir 1 kg de biomassa, e se esta biomassa tiver cerca de 50% de triacilglicerídeos, aproximadamente 1.800 L de cultura seriam necessários para produzir 1 litro de óleo de microalga. Com relação aos custos da produção do óleo, segundo o cálculo realizado pela *Argonne National Laboratory's GREET model* em 2007, o preço do óleo seria de US\$ 8,52/galão de triacilglicerídeos e de US\$ 18,10/galão triacilglicerídeos, utilizando o cultivo em *raceways* e fotobioreator (cultivo fechado), respectivamente, e quando convertidos em biodiesel os valores sobem para a US\$ 9,84 e US\$ 20,53/galão de biodiesel (DAVIS; ADEN; PIENKOS, 2011).

A produção do biodiesel de microalgas, da fase da colheita à extração, é um importante fator limitante para o equilíbrio entre a economia e a sustentabilidade global (CHIARAMONTI et al., 2016). Atualmente as pesquisas com relação ao óleo produzido por microalgas estão

centradas principalmente nos métodos de extração e conversão do óleo em biodiesel (DONG et al., 2016; SUN et al., 2011). Como as microalgas acumulam os lipídios intracelularmente, os procedimentos de extração do óleo são complexos e requerem técnicas que sejam economicamente viáveis. Ainda há discussão sobre a retirada do óleo em relação aos métodos de extração úmida e seca, no entanto, as rotas de extração mais usuais são as secas, principalmente para poder aproveitar a biomassa para a obtenção de coprodutos e, assim, agregar valor ao produto final, porém a extração úmida gasta menos energia e é considerada mais sustentável (CHIARAMONTI et al., 2016). Os processos de extração úmida incluem o uso de micro-ondas, ultrassons, alta pressão, alterações súbitas de pressão, abordagens biológicas (por exemplo, o uso de enzimas para a ruptura celular e estresses osmóticos, ou processamento termoquímico (por exemplo, a hidro liquefação térmica). Os processos termoquímicos também estão inclusos na extração seca, como a pirólise e a transesterificação (CHIARAMONTI et al., 2016; REDDY et al., 2014).

Para o barateamento dos sistemas de cultivo procura-se uma combinação de diversos fatores para incrementar a produção de biomassa de microalgas potencialmente importantes à produção de biodiesel, como por exemplo a utilização de meios alternativos e de baixo custo, usualmente elaborados a partir de resíduos de atividades humanas pode se tornar muito promissor, especialmente porque os cultivos poderiam minimizar os gastos com as formulações dos meios de cultura sintéticos baseados em produtos químicos, melhorando ao mesmo tempo a qualidade ambiental reduzindo a carga de poluição dos efluentes gerados por essas atividades e seus impactos decorrentes. Nesse contexto seria uma grande vantagem na utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis e inúmeras pesquisas têm sido feitas ou recomendadas utilizando diferentes tipos de efluentes de atividades industriais, como dejetos suínos (BAI et al., 2012; DELABARY, 2012; GAN et al., 2014; ZHU et al., 2013), vinhaça (RAMIREZ et al., 2014), esgoto humano (KLIGERMANN et al., 2015; SHARMA; KAHN, 2013;) e manipueira (BORGHETI, 2009), dentre outros. Microalgas podem ser facilmente cultivadas em locais com solo de baixa fertilidade, que não são susceptíveis a práticas agrícolas, assim como em águas salgadas e salobras.

Ao longo dos últimos anos, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem despertado interesse considerável e, atualmente, um número crescente de empresas está investindo no desenvolvimento de biocombustíveis de algas e estão centrando esforços para a comercialização. A maioria das empresas é da América do Norte, com os Estados Unidos liderando o *ranking* com a Algenol, Aurora Algae Inc., Chevron, Diversified Energy, Green Fuel Technologies, Iventure, Live Fuels, Origin Oil, Sapphire Energy, Solix, e o Canadá, com

a Pond Biofuels; América do sul, Oil Fox (Argentina); Ásia, com DENSO Corporation, Euglena, IHI Corporation, Isuzu Motors (Japão), BRteam (Iran); Oceania, Algae Tec.(Austrália); África, ALG Western Oil (África do sul) e Europa, Algae Link (Holanda), AlgaFuel (Portugal), BP, (Inglaterra), ENI (Itália), Greon (Bulgária), Neste oil (Finlândia), Total (França) e Varicon Acqua Solution (Reino Unido) (SABER; NAKHSHINIEV; YOSHIKAWA, 2016).

Apesar de haver diversos gargalos na produção de biocombustíveis a partir de microalgas, é notório que no futuro haverá um sucesso comercial das microalgas e, certamente, deverá estar baseado no desenvolvimento de linhagens que apresentem rápida produção de biomassa e elevado conteúdo lipídico, além de mínimo crescimento de cepas contaminantes ou de outros organismos como predadores e patógenos que podem influenciar no rendimento dos cultivos.

### 3.3 BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES E MICROALGAS

O termo biorremediação é aplicado a todos os processos que promovem a degradação biológica de poluentes mediante o uso de organismos vivos ou de compostos derivados de organismos vivos como as enzimas, e cujo propósito é a remoção ou a redução de contaminantes do ambiente, sejam eles de natureza física, química ou biológica, destacando-se, neste caso, principalmente moléculas orgânicas recalcitrantes oriundas do metabolismo biológico ou xenobióticas, a exemplo de corantes, fármacos, plásticos e polímeros, que podem ter efeitos nocivos ao ambiente e/ou de potencial mutagênico. O emprego da biorremediação, nestes casos, lança mão de organismos que tem a capacidade de degradar os compostos xenobióticos, minimizando, assim, os riscos que eles representam ao ambiente e às comunidades biológicas que nele existem (GAYLARD et al., 2005).

Comparado com outras técnicas de tratamentos convencionais de efluentes, a biorremediação tem custo muito inferior (KUIPER et al., 2004) e mostra-se extremamente eficiente em muitos propósitos. Entretanto, frente a enorme diversidade de contaminantes químicos que entram no ambiente através dos inúmeros processos antrópicos, nem sempre a degradação biológica mostra-se eficaz devido à complexidade das reações envolvidas entre os microrganismos e os poluentes e à escassez de dados para muitos desses compostos (WACKETT; HERSHBERGER, 2001). Reconhece-se, assim, que a biorremediação é um campo fértil de investigação em muitas áreas, como engenharia metabólica, proteômica, genética reversa, transcriptômica, metabolômica e modelagem metabólica em escala genômica.

No caso de contaminação de ambientes aquáticos, as técnicas de biorremediação podem incluir diversos processos a depender do tipo de contaminante que entra no sistema, sendo estas técnicas extremamente importantes em função das necessidades crescentes de água e do concomitante incremento dos perigos que a água contaminada traz para a saúde pública. Grande parte das reservas hídricas do globo que se destinam ao consumo humano é susceptível a contaminações com inúmeras substâncias químicas tóxicas, incluindo compostos orgânicos sintéticos, a exemplo de hidrocarbonetos aromáticos, solventes clorados e pesticidas, além da contaminação com compostos inorgânicos como nitrato, arsênico, selênio, chumbo, cádmio, cromo, mercúrio e outros metais, além de radionucleotídeos. O caso é tão sério, que até mesmo os lençóis de água subterrânea estão sendo contaminados, colocando em risco a saúde da população que faz uso dessas águas (ALVAREZ; WILMAN, 2006).

Na lista dos produtos mais perigosos encontram-se ainda os medicamentos humanos e de uso veterinário, como analgésicos, betabloqueadores, agentes redutores de lipídios e hormônios sintéticos, os diversos tipos de pesticidas como lindano, DDT, antrazina, diuron, glifosato, simazina e amitrol, e alguns químicos sintéticos como o nonilfenol, bisfenol A e os ftalatos, que são poluentes emergentes que afetam a reprodução humana e animal por funcionarem como disruptores endócrinos. Nesta lista incluem-se ainda diversos compostos mutagênicos e carcinogênicos, como benzeno e tricloroetileno (ALVARES; WILMAN, 2006).

Os custos necessários para minimizar os efeitos da contaminação são exageradamente altos e tendem a aumentar a cada ano. Só nos Estados Unidos, estima-se que para limpar mais que 300.000 áreas contaminadas seriam necessários mais de 500 bilhões de dólares, enquanto que na Europa os custos de remediação de locais contaminados com resíduos perigosos deverão exceder 1,5 trilhões de dólares no futuro próximo (ALVARES; WILMAN, 2006).

Diversas técnicas têm sido aplicadas na biorremediação, a exemplo do bioaumento, que consiste na adição de organismos capazes de degradar hidrocarbonetos presentes e que utilizam bactérias autóctones e exógenas; no bioestimulo, há adição de nutrientes ou fontes de nitrogênio e fósforo para ativar o metabolismo dos microrganismos presentes, sendo que esta técnica pode ser utilizada conjuntamente com a anterior; na bioventilação injeta-se oxigênio no solo, promovendo o arraste do contaminante para fora; na fitorremediação utiliza-se plantas que absorvem o contaminante, mantendo o composto na estrutura da planta para depois degradá-lo; a fitofiltração, em que as raízes de plantas aquáticas absorvem os contaminantes transportando-os por sua estrutura e por meio das folhas os volatilizam, mantendo assim os aquíferos limpos; e a atenuação natural, em que a água se recupera por si mesmo com o tempo (LOZANO, 2005).

A descontaminação de ambientes afetados por metais pesados tem sido testada com vários organismos, como *Saccharomyces cerevisiae* (BELEZA, 2006), e a biorremediação de alguns pesticidas tem sido testada com oligoquetas (TABCHE et al., 2001). A remoção de corantes de indústria têxtil tem sido testada com sucessos com a cianobactéria *Phormidium* sp. imobilizada com suporte a base de alginato de cálcio evidenciando-se uma capacidade de remoção do corante entre 50 a 88% em todas as concentrações testadas (DÖNMEZ et al., 2008). Hodaifa et al. (2008) investigaram o uso de efluente industrial, especificamente a água de enxágue proveniente da centrifugação do óleo de oliva, para a produção de biomassa de *Scenedesmus obliquus*. Constataram que a maior síntese proteica durante a fase exponencial de crescimento foi de 3,7 mg L<sup>-1</sup> para 50% de água de enxágue. A biomassa de lipídios, segundo os autores, foi dependente da porcentagem de água residual utilizada como meio nutritivo, alcançando os maiores teores de ácidos graxos monoinsaturados, poli-insaturados e ácidos graxos essenciais em 100% de água de enxágue como meio de cultivo.

Os estudos direcionados ao combate da contaminação ambiental por hidrocarbonetos são numerosos em decorrência do grande número de acidentes de petróleo ocorridos em diversas partes do planeta e da necessidade de minimizar as consequências dos danos ambientais desses episódios. A eficácia de biorremediação nesses casos foi testada com diversos microrganismos, incluindo *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., além de alguns fungos e estreptomicetos que atuam na decomposição de hidrocarbonetos aromáticos (WILLIAMS, 1975). Dados da literatura também indicam que outras bactérias e alguns fungos estão envolvidos em processos degradativos de derivados do petróleo. Poucas espécies de algas podem degradar o petróleo cru, destacando-se a microalga *Prothotheca zopfi* (WALKER et al., 1975), uma alga aclorofilada que tem afinidade filogenética com a clorofícea *Chlorella*, sendo que o gênero compreende quatro espécies conhecidas: *P. zofti*, *P. moriformis*, *P. wickerhamii* e *P. stagnora* (PORE, 1985), e as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, ambas clorofíceas que também tem sido estudadas quanto sua capacidade de degradar petróleo (EL-SHEEKK; HAMOUDA; NIZAM, 2013). Além disso, estudos sobre a degradação do óleo cru utilizaram consórcios de microalga-bactéria, principalmente entre a clorofícea *Scenedesmus obliquus* e as bactérias *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Pandoraea pnomenusa* e *Burkholderia cepacia* (TANG et al., 2010). *Bacillus alcalophilus* tem sido testada quanto sua capacidade de remover naftaleno, usando este composto como única fonte de carbono e energia (MOREIRA et al., 2004).

Um grande problema que vem afetando em particular os ecossistemas aquáticos diz respeito à entrada de nutrientes nesses ambientes através de efluentes domésticos, industriais e

agrícolas. O excesso de nutrientes em corpos hídricos leva a eutrofização, alterando as redes tróficas, favorecendo a proliferação de bactérias e outros organismos planctônicos muitas vezes com espécies indesejáveis, e promovendo uma elevada demanda de oxigênio. A perda de qualidade da água inviabiliza outros usos nobres da água, a exemplo do consumo humano e dessedentação de animais, com graves prejuízos também a pesca e à biodiversidade local.

Diversas técnicas de descontaminação de ambientes aquáticos têm sido adotadas e algumas delas são utilizadas rotineiramente, a exemplo do que é praticado em estações de tratamento de água e esgoto. Remoção de nutrientes de águas subterrâneas ou de mananciais eutrofizados por meio de tratamentos químicos ou físicos como troca iônica, osmose reversa, eletrodialise e desnitrificação catalítica, usualmente acompanhados por nitrificação e desnitrificação microbiana são processos caros e difíceis (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1997), pois necessitam de grandes subsídios energéticos (eletricidade, fontes de carbono orgânico, etc.) e aditivos químicos.

Águas residuais em geral podem conter concentração de 10-100 mg.L<sup>-1</sup> de N ou P, elementos principais envolvidos na eutrofização, além de metais pesados e outras toxinas (DEBASHAN; BASHAN, 2010), e um método eficiente no tratamento desses efluentes é utilizá-lo como fonte nutricional de baixo custo no cultivo de diversos microrganismos, incluindo microalgas (CHEN; ZHAO; QI, 2015).

A utilização de microalgas nesse processo mostra-se vantajosa, visto que esses organismos utilizam compostos inorgânicos simples para o seu crescimento como nitrato e fosfato e utiliza diretamente a luz solar para converter compostos de baixa energia em compostos altamente energéticos e formar proteínas e outros compostos. Além disso, esses organismos apresentam taxas de crescimento muito rápidas quando comparadas às plantas terrestres, de modo que se mostram muito mais eficientes em processos de biorremediação desses compostos em curtos períodos de tempo (HU et al., 1996, 1998).

As microalgas têm alto potencial para remover nutrientes de águas residuais e de acumular biomassa que pode ser usada para a produção de biocombustíveis (SAMORI et al., 2013) e diversos estudos utilizando o cultivo de algas são realizados em áreas como tratamento de águas residuais de processos industriais, detoxificação biológica e remoção de metais pesados. Segundo Hoffman (1998) elas têm sido mais eficazes na remoção de N, P e metais pesados em comparação com tratamentos químicos, sendo portando muito eficientes em processos de biorremediação.

Além disso, as microalgas também têm sido utilizadas como bioindicadores para detecção de nutrientes e substâncias tóxicas e compostos orgânicos tóxicos diversos como

detergentes, efluentes industriais, e herbicidas e pesticidas (BRUNO, 2001; DINIS et al., 2004; GROBBELAAR, 2004; LOBO; CALLEGARO; BENDER, 2002; LOBO et al., 2004; RICHMOND, 2004). Muitas das espécies estudadas incluem as clorofíceas *Chlorella* spp., *Scenedesmus dimorphus*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e algumas cianobactérias como *Spirulina* spp., *Arthrospira* spp. (BOROWITZKA, 1999). No final do século XX os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* foram utilizados com êxito em estudos voltados à remoção de nutrientes (TWIST; EDWARD; COD, 1998). Algumas cianobactérias têm sido utilizadas na biorremediação de águas contaminadas com arsênio (SOUZA, 2007; FERREIRA, 2013) e na remoção de nutrientes de dejetos suínos (DELABARY, 2012), bem como no tratamento de esgoto (SINGH; THAKUR, 2015).

A lista de estudos a este respeito é crescente a cada dia e considerando o interesse crescente da utilização de microalgas para produção de bioenergia e extração de diversos produtos de interesse comercial, tais como pigmentos, proteínas e lipídios, a utilização desses organismos em programas de biorremediação pode se tornar muito promissora. A bioprospecção de espécies de interesses biotecnológicos que possam ser cultivadas em larga escala em meios alternativos constituídos à base de diferentes tipos de efluentes mostra-se como uma importante alternativa no tocante à produção de biomassa de microalgas, quer seja para a produção de energia ou de coprodutos de importância comercial obtidos a partir desses resíduos. Além de propiciarem melhoria de qualidade ambiental minimizando os impactos de emissões nocivas, o cultivo de microalgas nesses tipos de meio pode ter um grande reflexo na economia, devendo assim ocupar um papel de destaque cada vez maior no futuro, tanto para geração de energia como de outros produtos que agreguem valor à biomassa microalgácea produzida nesses processos.

## **CAPÍTULO 4**

**ARTIGO: EFETIVIDADE DO USO DE MICROALGAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE  
ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL**

## EFETIVIDADE DO USO DE MICROALGAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL

### RESUMO

O biodiesel pode ser obtido a partir de óleos de plantas oleaginosas como a soja, a palma, mamona e dendê, ou a partir de microrganismos, como as microalgas. Sua produção é baseada na transesterificação e este procedimento gera a água de lavagem, que contém resíduos de sabões, ácidos graxos, metanol ou etanol e outros contaminantes. A água de lavagem de biodiesel é um efluente industrial tóxico que deve ser previamente tratado antes do descarte. A utilização deste efluente como fonte nutricional de baixo custo para o cultivo de microalgas pode ser uma forma de tratamento suplementar eficiente e rentável. Neste trabalho, 11 espécies de microalgas que apresentam uso potencial para a produção de biodiesel foram testadas neste tipo de efluente avaliando-se sua capacidade de crescimento, produção de biomassa e rendimento final de número de células. Apenas as espécies *Monoraphidium contortum*, *Ankistrodesmus sp*, *Chlorococcum sp*, e uma clorofícea não identificada mostraram desenvolvimento positivo neste tipo de efluente. *Monoraphidium. contortum* apresentou maior capacidade de crescimento e é segunda espécie que apresenta maior teor de ácidos graxos. Na segunda etapa do experimento, a microalga foi cultivada novamente em água de lavagem de biodiesel na diluição de 75% e em meio WC (controle), em triplicatas, em balões de 6 L de capacidade. Todos os cultivos foram realizados nas mesmas condições de luz, temperatura e aeração. Análises de nitrato, fosfato e DQO foram efetuadas após 21 dias de cultivo desta espécie em água de lavagem de biodiesel na concentração de 75% demonstraram capacidade efetiva de remoção desses compostos nas porcentagens de 25,8%, 7,2% e 31,2%, respectivamente.

**Palavras-chave:** Tratamento de efluentes, Cultivos fotoautotróficos, Remoção de nutrientes, Ácidos graxos.

## ABSTRACT

Biodiesel can be obtained from oleaginous plant oils such as soybean, palm, castor oil, or from microorganisms, such as microalgae. Its production is based on the transesterification and this generates the wash water containing waste, like soaps, fatty acids, ethanol and methanol or other contaminants. Biodiesel wash water is a toxic industrial effluent that must first be treated before disposal. The use of this effluent as a nutritional source of low cost for the microalgae cultivation can be efficient and cost effective further treatment. In this paper, 11 species of microalgae that have potential use for biodiesel production were tested in this type of effluente evaluating its capacity for growth, biomass production and final yield of cell number. Only species *Monoraphidium contortum*, *Ankistrodemsus* sp., *Chlorococcum* sp. and chloroficea unidentified showed positive development in this type of effluent. *Monoraphidium contortum* showed greater growth capacity and is second species with the highest content of fatty acids. In the second stage of the experiment, the microalgae was cultured again in biodiesel wash water at a dilution of 75% and médium WC (control) in triplicate in 6L flasks capacity. All cultures were performed in the same light conditions, temperature and aeration. Analysis of N, P and COD were taken after 21 days of culture of this kind biodiesel wash water at a concentration of 75% showed effective capacity of removing these compounds in percentages of 25.8%, 7.2% and 31.2 %, respectively.

**Keywords:** Effluents treatment, Photoautotrophic cultivation, Nutrient removal, Fatty acids.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética ocasionada pelo incremento dos transportes e das atividades industriais promoveu diversos impactos ambientais, levando a sociedade atual à procura por outras fontes de energia baseadas em processos de produção sustentáveis. A busca por energias alternativas e renováveis surge neste contexto, sendo o biodiesel um dos exemplos que tem se mostrado muito promissor tanto em termos de produção como de aceitabilidade. Sua utilização já está consolidada em muitos países e o seu consumo cresce anualmente no Brasil. O biodiesel, a exemplo de outros biocombustíveis é derivado de biomassa que é considerada a quarta maior fonte de energia depois do petróleo, do carvão mineral e do gás natural (GUPTA; VERMA, 2015).

No Brasil, o biodiesel surgiu como uma consequência de diversos choques do petróleo, resultando a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975, cujo objetivo foi estimular a substituição da gasolina pelo álcool. O segundo choque do petróleo, ocorrido em 1980, estimulou a pesquisa para a adequação dos motores dos automóveis à utilização do etanol, e com a queda dos preços do petróleo, na década de 1990, os preços da gasolina se equipararam a do álcool, passando o etanol a representar de 20% a 25% no percentual da gasolina. Em 2005 surge o Programa Nacional do Biodiesel como alternativa a eventuais crises do petróleo, aumentando, em consequência as pesquisas relacionadas à sua produção (ANP, 2015) e em 2006 foi promulgada a resolução ANP 15/2006 que normatiza a mistura óleo diesel/biodiesel (LÔBO; FERREIRA, 2009).

Em 2007 o Brasil produziu 404.329 m<sup>3</sup> de biodiesel puro (B100) e em 2008 tornou-se obrigatória a utilização do B2 (diesel com adição de 2% do biodiesel), crescendo este percentual para 5% até 2013, conforme determina a Lei 11097/05 (LÔBO; FERREIRA, 2009; ANEEL, 2015). A entrada em vigência em 2014 da utilização do B7 (7% do biodiesel no diesel) demonstrava que o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel cada vez mais se consolidava.

A implantação do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC), em 2007, pelo Governo Federal, com mais de 17 bilhões de reais de investimentos em obras de usina de etanol e biodiesel (ANEEL, 2015) fez com que o Brasil chegasse a produzir 2,9 bilhões de litros em 2013 (ANP, 2015). Os dados colocam o país como um dos maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo e mostram que ações políticas que estimulam a produção e a mistura, oferecendo incentivos fiscais e políticas de compra são essenciais para o sucesso da produção

e uso desse tipo de energia. Segundo Morales et al. (2015) ações como essas têm sido cada vez mais implementadas também em países da Europa, Ásia e no Estados Unidos.

O biodiesel pode ser obtido a partir de óleos de plantas oleaginosas como a soja, a palma, mamona e o dendê, ou a partir de microrganismos, como as microalgas. Com relação ao diesel convencional, o biodiesel produz menos material particulado, é praticamente livre de enxofre, mas é facilmente biodegradável, o que representa um problema na sua estocagem (GOLDEMBERG; LUCON, 2011).

Sua produção é baseada na transesterificação de gorduras vegetais ou animais e nessa reação utiliza-se um triglicerídeo juntamente com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) que reagem na presença de um catalisador, formando glicerina e uma mistura de alquil ésteres o biodiesel propriamente dito (ATADASHI et al., 2012). Esses catalisadores podem ficar incorporados aos produtos da reação, aumentando o custo do biodiesel pela necessidade de um processo de purificação. Nesta etapa de purificação do biodiesel também são retirados resíduos de glicerina, sabões e ácidos graxos, resquícios de metanol e catalisadores, através de uma lavagem do produto com água (GRANGEIRO, 2009; GRANJEIRO et al., 2014; ATADASHI et al., 2012). Este procedimento produz um resíduo líquido, denominado água de lavagem, que contem resíduos de sabões, ácidos graxos, metanol ou etanol e outros contaminantes (NOUREDDINI, 2001), sendo essa água residual de difícil degradação natural, uma vez que sua composição torna desfavorável o crescimento de microrganismos (FERRERO et al., 2010).

A purificação do biodiesel com água é a mais utilizada por atender padrões de qualidade deste biocombustível (FERRERO et al., 2010). Para cada litro de biodiesel são necessários no mínimo 3 litros de água de lavagem (BRITO et al., 2012), ou 20 litros de água residual para cada 100 litros de biodiesel produzidos, segundo Suehara et al. (2005). Somente em 2011 a produção mundial de água de lavagem de biodiesel foi da ordem de 28 milhões de m<sup>3</sup> (VELJKOVIC et al., 2012), e em 2015 somente o Brasil produziu 3,6 bilhões de litros de biodiesel, gerando, em consequência, mais de 10 bilhões de litros de água residual (ANP, 2015).

A água de lavagem é considerada um efluente industrial por conter substâncias químicas poluentes que podem causar diversas alterações nos ecossistemas (SANDUN et al., 2007; KUMJADPAI et al., 2011; EL-KASSAS; MOHAMED, 2014), sendo, portanto, um grande problema para o ambiente e para as indústrias (DAUD et al., 2015). Desse modo, urge a necessidade de se desenvolver tecnologias ambientalmente efetivas de uso/descarte do resíduo, uma vez que as águas de descarte resultantes da produção do biodiesel mostram-se quimicamente inadequadas para serem lançadas nos corpos hídricos (BRITO et al., 2012). Tratamentos que possam reduzir substancialmente a concentração dos contaminantes presentes

neste tipo de efluente tornam-se necessários a fim de minimizar o potencial de contaminação dessas águas residuais.

Em geral, águas residuais podem conter concentração de 10-100 mg.L<sup>-1</sup> de N ou P, metais pesados e outras toxinas (DE - BASHAN; BASHAN, 2010) e um método eficiente no tratamento desses efluentes é utilizá-los como fonte nutricional de baixo custo no cultivo de diversos microrganismos, incluindo microalgas (CHEN; ZHAO; QI, 2015). As microalgas têm alto potencial para remover nutrientes de águas residuais e de acumular biomassa para a produção de biocombustíveis (SAMORI et al., 2013) e segundo Hoffman (1998) elas têm sido mais eficazes na remoção de N, P, metais pesados e compostos orgânicos tóxicos em comparação com tratamentos químicos. A desvantagem do uso desses microrganismos nesse processo é que muitos deles têm seu crescimento inibido pela presença de compostos tóxicos do efluente, e a principal vantagem com relação aos métodos convencionais é a economia de custos tornando-se assim uma forma mais atraente a ser adotada principalmente pelos países em desenvolvimento (PITTIMAN et al., 2011). Neste trabalho avaliou-se a efetividade do uso de microalgas potencialmente promissoras à produção de biodiesel na biorremediação de água de lavagem de biodiesel, previamente tratada, em experimentos laboratoriais controlados.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 COLETA, PROCESSAMENTO E ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL

Água de lavagem previamente tratada foi cedida ao Centro de Energias Alternativas e Renováveis da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por uma usina produtora de biodiesel localizada no município de Quixadá, Estado do Ceará. O material foi deixado em decantação e o sobrenadante foi retirado, através de sifonagem reversa, filtrado em papel-filtro qualitativo e posteriormente esterilizado em autoclave. As características físico-químicas (Nitrato, Fosfato, pH, DQO, turbidez, condutividade elétrica e sólidos totais) da água de lavagem foram determinadas em laboratório usando sonda multiparâmetros e com base nos procedimentos de análise do Standard Methods (APHA, 1998).

### 4.2.2 ANÁLISES DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM MICROALGAS PRÉ-SELECIONADAS

Um total de 11 espécies de microalgas dulcícolas isoladas de vários mananciais regionais (Tabela 4.1) foi selecionado do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), das quais 10 delas vêm sendo mantidas em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) e um em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Essas espécies foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura, em balões de vidro de 6 litros de capacidade, numa câmara de cultivo a  $25 \pm 1$  °C, com sistema de iluminação e fotoperíodo de 12 horas, com aeração contínua por injeção contínua de ar a pressão ambiente ( $2,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) usando um minicompressor de membrana Resun AOC2. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenhal em microscópio binocular Leica, e através de medidas da fluorescência *in vivo* usando um fluorômetro Turner Design 10005R, para a determinação das curvas de crescimento. Os experimentos foram interrompidos no início da fase estacionária e a biomassa produzida foi concentrada em centrífuga refrigerada ( $-18$  °C), congelada em ultrafreezer ( $-30$  °C) e, posteriormente liofilizada. A biomassa obtida foi pesada em balança analítica. O perfil e os teores de ésteres de ácidos graxos (*Fatty Acids Methyl Ester* – FAME's) foram determinados por cromatografia gasosa (Cromatógrafo a Gas Agilent 7890, equipado com detector FID e injetor split/splitless), após transesterificação direta da biomassa microalgal, e seus valores

foram comparados com o teor da soja, como referência, conforme procedimento de Antoniosi (1995), adaptado para microescala, e Menezes et al. (2013).

Tabela 4.1. Espécies de microalgas selecionadas para a determinação do teor de ácidos graxos.

Linhagens	Espécie/Gênero	Procedência
D121WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Frei Martinho – PB
D173WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	Lagoa Tapada – PB
D174WC	<i>Cosmarium</i> sp.	Açude Itapororoca – PB
D77WC	Clorofíceas não identificadas	João Pessoa – PB
D128WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Balneário Pitimbú – PB
D124WC	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	Açude Frei Martinho – PB
D125WC	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Balneário Pitimbú – PB
D109Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Nascente do rio Grau, Conde – PB
D137WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Açude São Anastácio – CE
D139WC	<i>Synechocystis</i> sp.	Lago do Hotel Village – PE
D136Z	<i>Chlorococcum</i> sp.	Prainha, Frei Martinho – PB

#### 4.2.3 CULTIVOS DE MICROALGAS EM ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL PREVIAMENTE TRATADA

Visando determinar quais das microalgas referidas na Tabela 4.1 apresentariam melhores respostas quando cultivadas em água de lavagem de biodiesel, as 11 espécies selecionadas foram inoculadas no efluente na concentração de 75%, em balões de 1 litro de capacidade e em triplicatas. O critério do percentual de diluição foi estabelecido a partir dos dados divulgados previamente por Sassi et al. (2014).

A microalga que apresentou maior crescimento nesta condição foi cultivada novamente em água de lavagem de biodiesel na diluição de 75% e em meio WC (controle), em triplicatas, em balões de 6 L de capacidade. Todos os cultivos foram realizados nas mesmas condições de luz, temperatura e aeração. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado também por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenthal e por medidas da fluorescência *in vivo*. Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa produzida ao final dos experimentos ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi determinada por diferença de peso mediante a filtração da amostra em filtro de fibra de vidro Whatman GF/C previamente pesado e secado em estufa a 60 °C. A densidade celular máxima foi determinada mediante contagens em câmara de Fuchs-Rozenthal,

sendo os cultivos interrompidos quando o frasco controle estava na fase estacionária. Todas as curvas obtidas nos experimentos foram ajustadas com o programa Microsoft Excel pela aproximação à curva logística, conforme Pindich e Rubinfeld (1981) e segundo Derner (2006).

#### 4.2.4 ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados utilizando o programa *Statistica 7.0*. A normalidade dos dados foi testada aplicando o teste de Shapiro-Wilk e as variações dos parâmetros analisados foram confirmados com o teste de homocedastidade (Teste Levene). As médias do número de células e rendimento de biomassa das cepas que apresentaram melhores crescimento foram comparadas pelo teste one-way ANOVA (post-hoc Tukey-HSD). Para todas as análises foi considerado  $p < 0,05$  como nível de significância.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 CARACTERÍSTICAS DA ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL

A água de lavagem do biodiesel usada nos experimentos mostrou pH próximo ao neutro, baixa turbidez e baixo valor de sólidos totais, elevada DQO e valores de fósforo muito superiores aos de nitrogênio (Tabela 4.2). Segundo Veljkovic et al. (2014) o pH deste tipo de efluente pode variar de 3,3 a 11,2 e os sólidos totais dissolvidos entre 0,3-8,9, porém o teor de fósforo e nitrogênio pode ser baixo ou nulo (DAUD et al., 2014). Esses valores diferem da quantidade de fósforo encontrada na água de lavagem utilizada neste trabalho. Essa diferença se deve ao sistema adotado para produção de biodiesel que influencia diretamente nas características do efluente. Ainda, segundo Daud et al. (2014) em alguns países da Ásia há normas de qualidade ambiental para o descarte dos efluentes industriais, como por exemplo o pH deve estar entre 6 e 9, o que corrobora com o pH encontrado na água de lavagem utilizada, por outro lado os valores de DQO não devem exceder o limite entre  $80 \leq 400 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  o que contrasta com os dados dessa pesquisa cujo valor foi de  $3051,5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ .

Tabela 4.2. Características físicas e químicas da água de lavagem da usina de biodiesel.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Condutividade elétrica	6,07 mS cm <sup>-1</sup>
Sólidos totais dissolvidos	3,82 g L <sup>-1</sup>
Turbidez	3,36 NTU
pH	7,29
Fosfato	80,21 mg L <sup>-1</sup>
Nitrato	4,49 mg L <sup>-1</sup>
Demanda química de oxigênio (DQO)	3051,5 mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup>

### 4.3.2 TOTAIS DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS DAS MICROALGAS ESTUDADAS

As 11 espécies selecionadas para os cultivos em água de lavagem de biodiesel apresentaram teores de ácidos graxos variando de 91,7 mg g<sup>-1</sup> (D136Z) a 584,9 mg g<sup>-1</sup> (D121WC) (Figura 4.1). Como se observa, as espécies D174WC e D173WC apresentaram valores de ácidos graxos superiores à soja, e a espécie D77WC mostrou valor próximo à soja.

Menezes et al. (2013) também encontraram microalgas dulcícolas que possuem teores de ésteres de ácidos graxos superiores à soja.

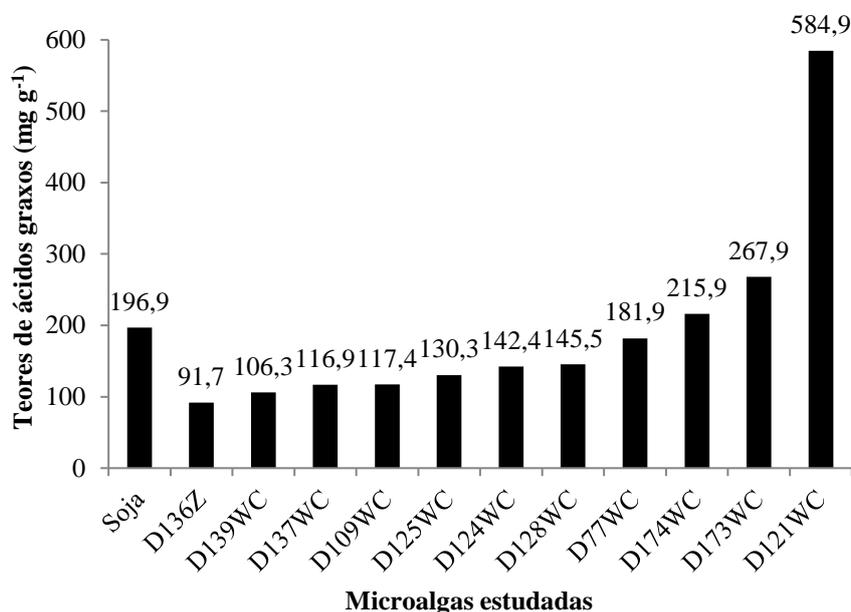


Figura 4.1. Teores de ésteres nas 11 espécies de microalgas selecionadas comparados com a soja.

#### 4.3.3 CRESCIMENTO DAS MICROALGAS SELECIONADAS EM ÁGUA DE LAVAGEM DE BIODIESEL

As análises de fluorescência das 11 microalgas evidenciaram que quatro espécies (D173WC, D77WC, D136Z, D124WC) apresentaram melhor desempenho nos cultivos em água de lavagem de biodiesel (Figura 4.2). Com relação ao número de células os resultados mostram que houve diferença significativa entre essas 4 espécies ( $F = 1122,010$ ;  $p = 0$ ), porém com relação a biomassa não houve diferença significativa ( $F = 0,361$ ;  $p = 0,782807$ ) (Figura 4.3). Também foi possível observar que a espécie D124WC apresentou maior valor de número de células e a espécie D77WC demonstrou maior quantidade de biomassa (g/L). Apesar dos dados de número de células e rendimento de biomassa não terem sido os mais favoráveis para a espécie D173WC em relação às outras três linhagens que apresentaram melhor desempenho, e também mostrou melhor crescimento (Figura 4.2) e o segundo maior valor com relação ao total de ésteres metílicos de ácidos graxos (Figura 4.1).

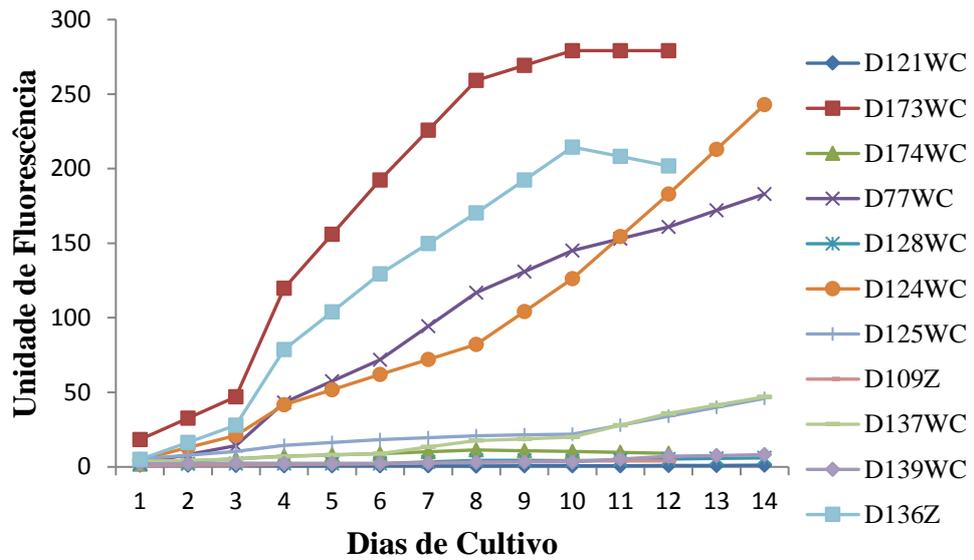


Figura 4.2. Curvas de crescimento das espécies testadas no cultivo com água de lavagem de biodiesel previamente tratada.

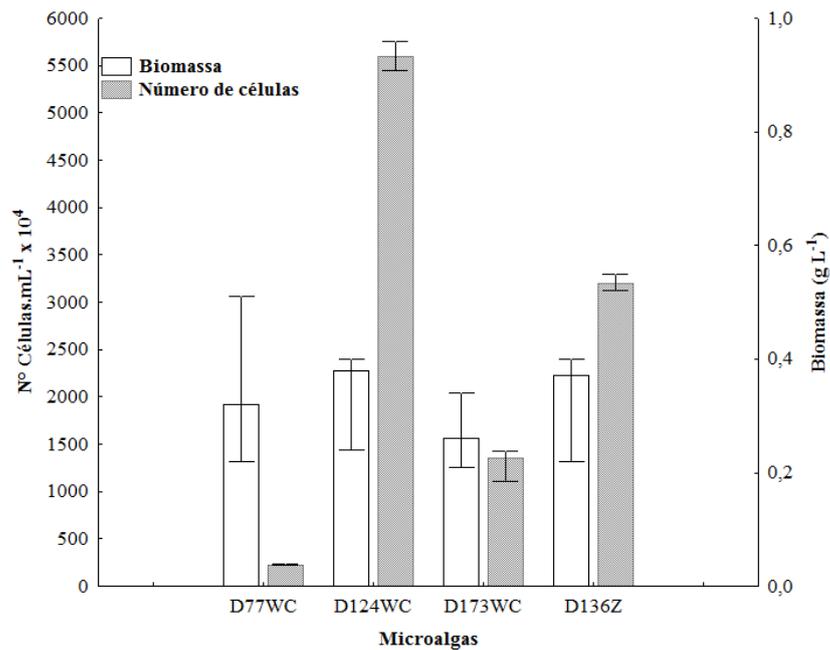


Figura 4.3. Rendimento celular ( $n^{\circ}$ células.mL<sup>-1</sup>.10<sup>4</sup>) e rendimento em biomassa (g L<sup>-1</sup>) das 11 espécies de microalgas cultivadas em água de lavagem de biodiesel.

Esses achados evidenciam que outras espécies de microalgas potencialmente produtoras de biodiesel também podem crescer em água de lavagem de biodiesel. Os dados evidenciaram, ainda, que a espécie mais produtora de ácidos graxos (D121WC) foi completamente inibida em água de lavagem de biodiesel, sendo assim inviável o seu cultivo neste tipo de substrato. Similarmente, outras espécies também mostraram forte inibição (D125WC, D137WC,

D174W), fato possivelmente associado à presença de compostos tóxicos no efluente (Figura 4.2). Os dados disponíveis até o momento acerca do crescimento de microalgas em água de lavagem do biodiesel são raros, muito embora Lamers (2010) também tenha encontrado bom desempenho com 7 espécies de microalgas cultivadas em água de lavagem de biodiesel, dentre 16 espécies testadas. Por outro lado, tentativas de cultivos heterotróficos de algumas microalgas têm sido investigadas em substratos contendo grandes concentrações de glicerina e outros compostos, substâncias comuns também na água de lavagem de biodiesel (MIAO; WU, 2006).

#### 4.3.4 CULTIVO DE *Monoraphidium contortum* (D173WC) EM ÁGUA DE LAVAGEM DO BIODIESEL

A espécie *Monoraphidium contortum* (D173WC) foi selecionada neste experimento pelo seu rápido crescimento nesse tipo de substrato e por ser a segunda espécie mais produtora de ácidos graxos (Figura 4.1 e Figura 4.2). O perfil de ácidos graxos desta espécie mostra predominância de ácidos palmítico (20,9%), 7,10,13 hexadecatrienóico (14%), oléico (16,2%), linoleico (10%) e linolênico (23,2%) (Tabela 4.3). Esses dados corroboram com os achados de Bogen et al. (2013), Lang et al. (2011) e Yu et al. (2012) que encontraram perfil similar.

Tabela 4.3. Perfil de ácidos graxos em biomassa seca de *Monoraphidium contortum*.

Ácido Graxos	Notação Taquigráfica	Teor (%)
Hendecanóico	C11:0	0,2
Láurico	C12:0	0,3
Tridecílico	C13:0	0,3
Mirístico	C14:0	0,9
Pentadecílico	C15:0	0,2
10-Pentadecaenóico	C15:1 <i>c10</i>	0,4
Palmítico	C16:0	20,9
Palmitoléico	C16:1 <i>c9</i>	0,8
7,10-Hexadecadienóico	C16:2 <i>c7,10</i>	1,5
Margárico	C17:0	2,0
6,9,12 Hexadecatrienóico	C16:3 <i>c6,9,12</i>	0,7
7,10,13 Hexadecatrienóico	C16:3 <i>c7,10,13</i>	14,0
Estearíco	C18:0	0,3
Oléico	C18:1 <i>c9</i>	16,2
Vacênico	C18:1 <i>c11</i>	1,1
Linoléico	C18:2 <i>c9,12</i>	10,5
Gama-Linolênico	C18:3 <i>c6,9,12</i>	0,7
Linolênico	C18:3 <i>c9,12,15</i>	23,2
Estearidônio	C18:4 <i>c6,9,12,15</i>	5,2
Araquídico	C20:0	0,1
Eicosapentaenóico	C20:5 <i>c5,8,11,14,17</i>	0,5

O cultivo desta espécie na concentração de 75% de água de lavagem de biodiesel evidenciou uma necessidade mais longa de aclimação ao meio, visto que no meio controle a fase estacionária foi obtida em cerca de 10 dias quando o cultivo em água de lavagem mostrava que a espécie ainda estava na fase de crescimento exponencial (Figura 4.4). No 21º dia o experimento foi interrompido, porém nos balões que continham água de lavagem de biodiesel a microalga ainda mostrava forte crescimento. Atadashi et al. (2012) consideram que a água de lavagem do biodiesel contém compostos tóxicos que podem inibir o crescimento de microrganismos, o que não foi constatado para esta espécie. A presença de N e P neste caso proporcionou uma condição favorável para o desenvolvimento desta microalga nesse tipo de substrato.

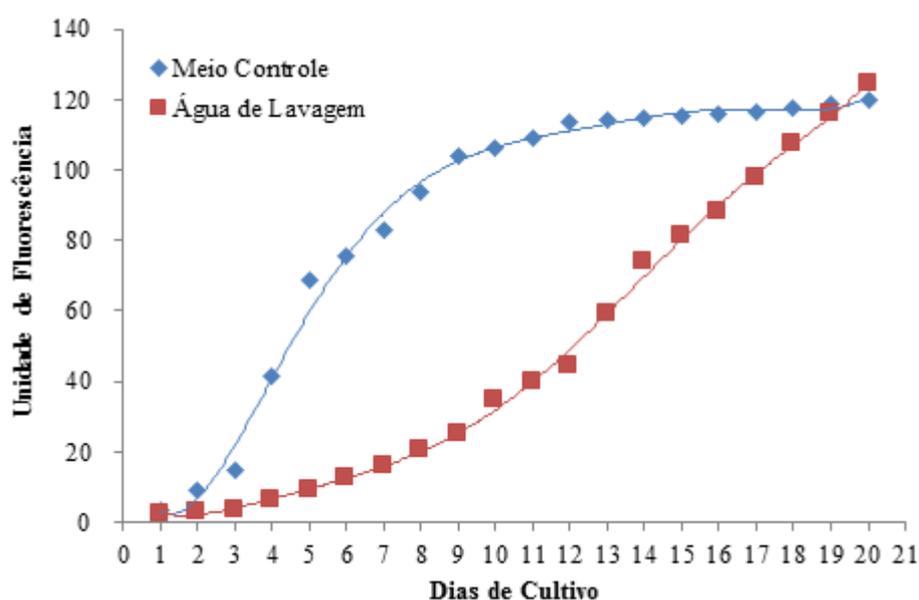


Figura 4.4. Crescimento da D173WC em meio controle e em água de lavagem de biodiesel com concentração de 75%.

Geralmente os tratamentos biológicos de água de lavagem do biodiesel consistem no uso de fungos e bactérias (LAMERS, 2010) e pouco se sabe sobre o uso de microalgas nesse processo, em consórcio ou não com outros microrganismos. Alguns autores relatam melhoria de outros tipos de resíduos industriais empregando espécies de microalgas (DIANURSANTI et al., 2014; FRANCISCO et al., 2015; KOTHARI et al., 2013; LIM et al., 2010; WU et al., 2012). Contudo, Chavan et al. (2008) tiveram sucesso no tratamento de um efluente petroquímico com alta carga orgânica aplicando um biofilme com associação entre uma espécie de cianobactéria e uma bactéria, sugerindo esses dados que consórcios de microalgas com outros microrganismos podem ser muito eficientes na biorremediação de água de lavagem de biodiesel. Desde que sabões e metanol presentes na água de lavagem do biodiesel interferem

negativamente no crescimento de microalgas é possível cultivar com sucesso tais organismos em glicerol derivado de biodiesel, após a retirada de sabões e metanol deste resíduo (CHI et al., 2007; PYLE et al., 2009).

#### 4.3.5 REMOÇÃO DE NUTRIENTES E DQO DA ÁGUA DE LAVAGEM DE BODIESEL POR *Monoraphidium contortum*

Os cálculos das porcentagens em remoção de nitrato, fosfato e DQO (demanda química de oxigênio) no meio controle e na água de lavagem do biodiesel na diluição de 75% evidenciam que em condições controladas de cultivo há remoção quase total de nitrato e fosfato no meio controle e que na água de lavagem de biodiesel os percentuais de redução foram mais expressivos apenas para nitrato e DQO (Tabela 4.4). Elevados percentuais de remoção de N e P também foram encontradas por Chinnasamy et al. (2010) em *Chlamydomonas*, *Chlorella* e *Scenedesmus* sp e por Lim et al. (2010) em *Chlorella vulgaris* em cultivos realizados com efluentes têxteis diluídos. Ressalta-se, no entanto, que na água de lavagem de biodiesel a espécie *Monoraphidium contortum* ainda se encontrava na fase de crescimento exponencial quando o experimento foi interrompido, evidenciando que esta microalga mostra um potencial efetivo de remover nitrato, fosfato e DQO neste tipo de efluente.

Tabela 4.4. Porcentagem de remoção de nitrato, fosfato e DQO pela microalga *Monoraphidium contortum* em duas condições de cultivo.

Condições de cultivo	% Remoção		
	Nitrato	Fosfato	DQO
Meio Controle (WC)	80,5	98,8	100
Água de lavagem de biodiesel a 75% de diluição	25,8	7,2	31,2

Chen et al. (2008) afirmam que resíduos industriais, como os provenientes de indústria alimentícia, têxtil, indústria de papel e celulose e de refinarias petroquímicas são ideais para a digestão anaeróbica, pois eles contêm altos níveis de materiais facilmente biodegradáveis, tornando assim os nutrientes disponíveis ao crescimento de microalgas. Entretanto, a água residual proveniente da produção de biodiesel é rica em ácidos graxos de cadeia longa que têm sido relatados como sendo inibidores do processo de degradação biológica (LÓPEZ et al., 2009), sendo desfavorável ao crescimento de microrganismos (KOLESÁROVÁ et al., 2011; SRIRANGSAN et al., 2009).

Os resultados do presente trabalho evidenciaram, no entanto, que mesmo com a presença de compostos de difícil biodegradação algumas espécies de microalgas podem crescer bem em água de lavagem de biodiesel previamente tratada, mostrando-se nesses casos como potenciais agentes mitigadores desse tipo de efluente. A linhagem D173WC apresentou este potencial na biorremediação da água de lavagem de biodiesel e como ela produz mais ácidos graxos do que a soja sua utilização no tratamento deste tipo de efluente pode ser relevante. Alterações nas suas respostas fisiológicas através de variações da temperatura e da luminosidade dos cultivos, ou mediante a introdução na água de lavagem de complementos nutricionais que aproxime este substrato ao meio controle poderiam incrementar mais ainda a produção de biomassa desta espécie neste efluente, o que seria de grande interesse às usinas que geram este tipo de efluente.

Um pré-tratamento da água de lavagem de biodiesel por eletrocoagulação (CERISOLA, 2006; EMAMJOMEH; SIVAKUMAR, 2009; FOUAD et al., 2009; PANIZZA; SRIRANGSAN et al., 2009) seguido por um tratamento biológico pode melhorar o processo da biodegradação por microrganismos (incluindo microalgas), podendo, assim, chegar a uma eficiência de 100% do tratamento (LÓPEZ et al., 2009). A utilização de microrganismos capazes de crescer em água de lavagem de biodiesel tais como fungos tem se mostrado muito eficiente na remoção de carbono orgânico total (FUKUDA; HABE; ITO, 2013), evidenciando que a microrremediação pode ser uma etapa importante por melhorar ainda mais as condições de cultivo de microalgas nesse tipo de substrato.

Desde que um dos principais gargalos do uso de microalgas para a produção de biodiesel derivado de óleos de microalgas é o elevado custo de produção (GRIMA et al., 2003), a busca por meios alternativos que diminuam os custos de produção de biomassa de espécies com elevada produtividade de óleos poderá aumentar a possibilidade de produção de biodiesel a partir de óleos de microalgas (CHISTI, 2007). Desse modo, a incorporação de técnicas de cultivos consorciados de bactérias/fungos e microalgas pode favorecer duplamente a cadeia produtiva do biodiesel, aumentando a eficácia da biorremediação da água de lavagem, minimizando impactos ambientais, e incrementando a produção de biomassa, que poderia ser destinada à produção de mais biodiesel.

#### 4.4 CONCLUSÕES

O cultivo de microalgas em águas residuais tem sido muito estudado, porém poucos trabalhos relatam o uso de microalgas como tratamento biológico para água de lavagem de biodiesel. A água de lavagem utilizada nesta pesquisa apresentou valores baixos de turbidez e sólidos totais dissolvidos e pH próximo ao neutro; no entanto, o valor encontrado para o fosfato foi elevado ( $80,21 \text{ mg L}^{-1}$ ) com relação ao teor de nitrato ( $4,49 \text{ mg L}^{-1}$ ). Foram testadas 11 espécies de microalgas nesse efluente, porém as linhagens que apresentaram melhor crescimento foram D173WC (*M. contortum*), D136Z (*Chlorococcum* sp.), D124WC (*Ankistrodesmus* sp.) e D77WC (Clorofícea não identificada). A espécie D173WC (*M. contortum*) apresentou o segundo teor de ácidos graxos ( $267,9 \text{ mg g}^{-1}$ ) dentre as 11 espécies testadas com perfil de ácidos graxos mostrando predominância dos ácidos palmítico (20,9%), 7,10,13 hexadecatrienóico (14%), oléico (16,2%), linoleico (10%) e linolênico (23,2%). Em função dessas características e por ter demonstrado um elevado crescimento em água lavagem de biodiesel foi selecionada para avaliar sua capacidade de mitigação deste efluente. O cultivo da espécie em água de lavagem de biodiesel mostrou que ela cresce mais lentamente no meio controle, atingindo a fase estacionária em 10 dias enquanto em água de lavagem ainda mostrava crescimento exponencial. Constatou-se que *M. contortum* foi capaz de remover 25,8% de nitrato, 7,2% de fosfato e 31,2% de DQO, evidenciando que é possível o cultivo de microalgas potencialmente promissoras para a produção de biodiesel nesse tipo de substrato, tornando esses cultivos duplamente importantes: na minimização de impactos ambientais em usinas produtoras de biodiesel e na produção de biomassa de microalgas que poderia ser incorporada à cadeia produtiva do biodiesel.

## REFERÊNCIAS

- ANEEL, 2015. <http://www.aneel.gov.br/>, acessado em janeiro de 2015.
- ANP - Agencia Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2015. <http://www.anp.gov.br/?id=470> (Accessed 29 September 2015).
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, Water Environmental Federation, 20th ed. Washington, 1998.
- ATADASHI, I.M., AROUA, M.K., ABDUL AZIZ, A.R., SULAIMAN, N.M.N.; J. High quality biodiesel obtained through membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 421–422, p. 154–164, 2012.
- DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611-1627, 2010.
- BRITO, J.F.; FERREIRA, L.O.; SILVA, J. P.; RAMALHO, T. C. Tratamento da água de purificação do biodiesel utilizando eletrofloculação. **Química Nova**, v.35, n. 4, p. 728-732, 2012.
- BOGEN, C.; KLASSEN, V.; WICHMANN, J.; RUSSA, M. L.; DOEBBE, A.; GRUNDMANN, M.; URONEN, P.; KRUSE, O.; MUSSGNUG, J. H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 622-626, 2013.
- CHAVAN, A; MURKHERJ, S. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 63–72, 2008.
- CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, 99, p 4044-4064, 2008.
- CHEN, G.; ZAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v.137, p. 282-291, 2015.
- CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-derived glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.
- CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R.; DAS, K.C. Biomass and energy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.17, p. 6751-6760, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

DAUD, M.N.; ABDULLAH, S.R.S.; HASAN, H.A.; YAAKOB, Z. Production of biodiesel and its wastewater treatment Technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, 2014.

DERNER, R. **Efeitos de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase nos ácidos graxos poliinsaturados**. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 2006.

DIANURSANTI.; RIZKYTATA, B.T.; GUMELAR, M.T.; ABDULLAH, T.H. Industrial tofu wastewater as a cultivation medium of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 56-61, 2014.

EL-KASSAS, H.Y; MOHAMED, L.A, Bioremediation of the textile effluent by *Chlorella vulgaris*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, p. 301-308, 2014.

EMAMJOMEH, M. M., SIVAKUMAR, M. Review of pollutants removed by electrocoagulation and electrocoagulation/flotation processes. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 5, p. 1663-1679, 2009.

FERRERO, G.O.; ALMEIRA, M.F.; ALVIM-FERRAZ, M.C. M.; DIAS, J. M. Water-free process for eco-friendly purification of biodiesel obtained using a heterogeneous Ca-based catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 121, p. 114-118, 2014.

FOUAD, Y.O.A., KONSOWA, A.H., FARAG, H.A., SEDAHMED G.H. Performance of an electrocoagulation cell with horizontally oriented electrodes in oil separation compared to a cell with vertical electrodes. **Chemical Engineering Journal**, v. 145, n. 3, p. 436-440, 2009.

FRANCISCO, E.C.; FRANCO, T.T.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPEZ, E. From waste-to-energy: the process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, p. 482-487, 2015.

FUKUDA, N.; HABE, H.; ITO, M.; Biodegradation of biodiesel wash water from a biodiesel fuel production plant. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 7, p. 525-532, 2013.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. *Energia, Meio Ambiente e Desenvolvimento*. 3.ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GRANGEIRO, R. V. T Caracterização da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

GRANGEIRO, R.V.T.; MELO, M.A.R.; SILVA, E.V.; SOUZA, A.G.; TOSCANO. I.A.S. Caracterização física, química e toxicológica da água de lavagem gerada na produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 9, n. 1, p. 78 – 83, 2014.

GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H.; FERNADEZ, F.G.A.; MEDINA, A.R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

GUILLARD R.R.L.; LORENZEN C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **J. Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUPTA, A.; VERMA, J.P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p.550-567, 2015.

HOFFMAN, P. Wastewater Treatment With Suspended and Nonsuspended Algae. *Journal of Phycology*, v. 34, p.757–763, 1998.

KOLESÁROVÁ, N.; HUTNAN, M.; BODÍK, I.; SPALKOVÁ, V. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. **J. Biomed. Biotechnol.** p. 1-15, 2011.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D.P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamidomonas poopyrenoideum* grown on dairy industry wastewater **Bioresource Technology**, v. 144, p. 499-503, 2013.

KUMJADPAI,S.;NGAMLERDPOKIN,K.;CHATANON,P.; LERTSATHITPHONGS, P.; HUNSOM, M. Management of fatty acid methyl ester (FAME) wastewater by a combined two stage chemical recovery and coagulation process. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 89, p. 369-376, 2011.

LAMERS, A. **The characterization of biodiesel wash water and the potential for microbial remediation.** MsC Thesis, Univ. Guelph, Faculty of Graduate Studies, 143p, 2010.

LANG, I.; HODAC, L.; FRIEDL, T.; FEUSSNER, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1 p. 124, 2011.

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

LÔBO, I.P.; FERREIRA, S.L.C. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LÓPEZ, J.A.S.; SANTOS, M.A.M.; PÉREZ, A.F.C.; MARTIN, A.M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5609-5615, 2009.

MENEZES, R.S; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONOISI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 13, n.1, p. 10-15, 2013.

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

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1349-1361, 2015.

NOUREDDINI, H.D.Z. Kinetics of tranesterification of soybean oil. **Biocatalysis Articles**, v. 74, n.11, p. 1457-1463, 1997.

PANIZZA M., CERISOLA, G. Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1179–1184, 2006.

PINDICH, R., RUBENFELD, D. Econometric models and economic forecasts. 2 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1981.

PITTIMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential os sustaintable algal biofuel production using wastewater resource. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011.

PYLE, D.J., GARCIA, R.A., WEN, Z. Producing DHA rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, n. 11, p. 3933-3939, 2009.

SAMORI, G.; SAMORI, 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, p. 791-801, 2013.

SRIRANGSAN, A., ONGWANDEE, M., CHAVALPARIT, O. Environ, Treatment of biodiesel wastewater by electrocoagulation process. **Journal Enviromental Asia**, v. 2, p. 15–19, 2009.

SUEHARA, K.; KAWAMOTO, Y.; FUJII, E.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v, 100, n. 4, p. 437–442, 2005.

SANDUN, F.; SUSHIL, A.; KIRAN, K.; RANJITHA, B. Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. **Fuel**, v.86, p. 2806–2809, 2007.

SASSI, P. G. P.; ABRAHAO, R. CALIXTO, C. D.; SANTANA, J. K. S. Cultivo de *Lagerheimia longiseta* (LEMMERMANN) PRINTZ, 1914 em efluentes de usina de biodiesel. Artigo do 9º Congresso Internacional de Bioenergia, São Paulo. 2013.

VELJKOVIC, V.B.; STAMENKOVIC, O.S.; TASIC, M.B. The wastewater treatment in the biodiesel production with alkali-catalyzed transesterification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**,, 32, 40-60, 2014.

YU, X.; ZHAO, P.; HE, C.; LI, J.; TANG, X.; ZHOU, J.; HUANG, Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. **Bioresource Biotechnology**, v. 121, p. 256-262, 2012.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A. P.; LEE, C. M. The feasibility of biodieselproduction by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 14-18, 2012.

## **CAPÍTULO 5**

**ARTIGO: APROVEITAMENTO DE EFLUENTES DE CARCINICULTURA PARA A  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS COM POTENCIAL USO EM  
BIOTECNOLOGIA**

## APROVEITAMENTO DE EFLUENTES DE CARCINICULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS COM POTENCIAL USO EM BIOTECNOLOGIA

### RESUMO

A atividade de carcinicultura é uma das principais causas da eutrofização em ambientes costeiros devido à alta carga de material orgânico e nutrientes na água dos viveiros de cultivo. Diminuir a emissão desses efluentes durante a despesca ou adequá-los a níveis de segurança ambiental torna-se uma prática não somente necessária, mas urgente. Processos de biorremediação usando cultivos integrados de organismos como macroalgas, animais filtradores e peixes têm sido sugeridos, mas poucos estudos têm sido efetuados com microalgas. Neste trabalho avaliou-se o potencial de crescimento da diatomácea marinha *Amphora* sp em água de viveiros de carcinicultura da aldeia indígena de Tramataia, litoral norte do estado da Paraíba, Brasil. Os ensaios foram realizados com o efluente coletado em dezembro de 2014 no momento de pós-despesca, utilizando-se balões de 6L em condições controladas de cultivo. Os experimentos foram realizados em triplicata, usando o meio Conway como controle e água de carcinicultura na concentração de 100%. Análises físico-químicas da água de carcinicultura mostraram elevadas concentrações de  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ , pH em torno de 8, salinidade de 34,8 psu, elevada turbidez e alta concentração de sólidos totais. Nas condições testadas, *Amphora* sp. mostrou um crescimento considerável no efluente de carcinicultura, porém inferior ao registrado no meio controle, embora em água de carcinicultura tenha sido mais rápido do que no meio controle. Constatou-se uma remoção de 72,4%, 72,3% e 46,4%, respectivamente para  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$  após 20 dias de cultivo, denotando, assim, um elevado potencial mitigador nesse tipo de efluente pela microalga estudada. As comparações das respostas fisiológicas efetuadas por citometria de fluxo demonstraram concentrações celulares mais elevadas de *Amphora* sp. no meio controle, mas proporcionalmente uma maior produção de lipídeos em água de carcinicultura. Neste efluente, a *Amphora* sp. também apresentou maior complexidade celular, indicando possivelmente maior acúmulo de moléculas de armazenamento, reforçando a maior produção de lipídeos nessa condição testada. Tais achados são surpreendentes, pois ao tempo em que esta espécie reduz as cargas de N e P do efluente testado sintetiza mais lipídeos que poderiam ser utilizados para a produção de biodiesel, reduzindo os custos de sua produção em meio sintético.

**Palavras-chave:** *Amphora* sp., Citometria de fluxo, Lipídeos, Biorremediação.

## ABSTRACT

Shrimp farming activity is a major cause of eutrophication in coastal environments due to the high load of organic matter and nutrients in the water of the culture ponds. Reduce the emission of these effluents for is harvesting or to ajust them to environmental safety standards becomes a practice not only necessary but urgent. Bioremediation processes using integrated cultures such as macroalgae, filter feeders and fish have been suggested, but few studies have been conducted with microalgae. In this work was evaluated the potential growth of marine diatom *Amphora* sp, in shrimp farm effluent of indigenous village of Tramataia, north coast of the state of Paraiba, Brazil. Assays were performed with the effluent collected in December 2014 at the time of post-fish removal, using balloons (6L) under controlled growing conditions. The experiments were performed in triplicate using the Conway medium as control and shrimp farm effluent at a concentration of 100%. The physical-chemical analysis of shrimp farm effluent showed high concentrations of NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub> and PO<sub>4</sub>, pH around 8, salinity 34.8 psu, high turbidity and high concentration of total solids. Under the conditions tested, *Amphora* sp. showed considerable growth in the effluent of shrimp, however lower than in the control medium, although in shrimp farm effluent has been faster than in the control medium. a removal of 73,357%, 72,572% and 66,667% were found respectively to PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> and NO<sub>2</sub> after 20 days of cultivation, showing thus a high bioremediation capacity of this type of wastewater by microalgae studied. Comparisons of physiological responses effected by flow cytometry showed higher cell concentrations *Amphora* sp. in the medium conway, but proportionally higher production of lipids in shrimp farm effluent. In this effluent, the microalgae *Amphora* sp. also showed higher cell complexity, possibly indicating greater accumulation of storage molecules, reinforcing the increased production of lipids tested in this condition. These findings are surprising because the time that this species reduces the loads of nitrogen and phosphorus from the effluent tested synthesizes more lipids that could be used for biodiesel production, reducing costs of production in synthetic medium.

**Keywords:** *Amphora* sp., Flow cytometry, Lipids, Bioremediation.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de camarões cultivados é da ordem de 4 milhões de toneladas/ano, a China produz 42% do total, representando 1,7 milhões toneladas/ano e é seguido por , Tailândia, Vietnam, Indonésia, Índia e Bangladesh. Na América Latina, os principais países produtores são o Equador, México e Brasil, seguidos de Colômbia, Honduras e Nicarágua, que juntos produzem cerca de 530 mil toneladas/ano (VALDERRAMA; ANDERSON, 2011), ou seja, 13,25% da produção mundial (JORRY, 2014). No ranking mundial o Brasil ocupa o sexto lugar, sendo a maior parte de sua produção (94%) exportada para a França, o Japão e a Espanha (MPA, 2011).

Os cultivos de camarão têm sido implantados tradicionalmente em áreas estuarinas, devido às facilidades naturais de captação de água para os viveiros, descarga de efluentes, baixo preço da terra e condições ambientais propícias ao cultivo. Entretanto, o desmatamento de mangue, um dos danos causados pela atividade, tem gerado um sério problema ambiental em muitos locais, não somente por seus efeitos sobre a biodiversidade ocasionados pela perda de habitat, mas também pelos eventos subsequentes à produção pesqueira, isto é, salinização de solos, além de inúmeros conflitos socioambientais em várias partes do mundo. A esses efeitos somam-se ainda a disseminação de doenças entre os camarões cultivados, redução da fertilidade do solo dos viveiros, contaminação das águas e dos sedimentos, salinização de aquíferos, introdução de espécies exóticas, deslocamento e migração de comunidades tradicionais, e deterioração da qualidade de vida e da segurança alimentar de comunidades tradicionais (EJS, 2003; NÓBREGA et al., 2013).

No Brasil, o camarão é cultivado em diversos estados costeiros, muito embora a maior parte da produção esteja concentrada nas regiões Norte e Nordeste. O Nordeste é a região que mais se destaca, e é responsável por 94% do total da produção nacional, especialmente os estados do Rio Grande do Norte e da Bahia, além do Ceará, da Paraíba, de Pernambuco e do Piauí, onde a atividade se apresenta em expansão (ABCC, 2004). Essa disparidade em relação aos outros estados da federação está associada, entre outros fatores, à extensa faixa litorânea nordestina e às condições climatológicas, hidrológicas e topográficas dessa região, que são ideais para o cultivo do camarão (CASTRO; PAGANI, 2004). Segundo Ribeiro et al. (2014), pode-se afirmar que o potencial do Brasil é superior ao da China, o maior produtor e exportador de camarão do mundo.

A principal espécie cultivada em nosso país *Penaeus vannamei*, (Boone, 1931), originário do Pacífico oriental, da região que vai do estado de Sonora, México, até o Norte do

Peru. Esta espécie adaptou-se muito bem a diferentes condições de cultivo nas regiões tropicais, sendo produzido em ambiente marinho, estuarino e lacustre, especialmente em águas alcalinas ou com algum percentual de sal, como acontece em muitas localidades da região semiárida brasileira.

O ápice da produção do Brasil ocorreu em 2003, com produtividade média de 6 ton/ha/ano, mas entre 2003 e 2011 houve uma redução significativa na produção nacional, que diminuindo de 75.904 toneladas em 2004 para 69.571 toneladas em 2011, com uma queda na produtividade de 4.510 kg/ha/ano para 3.505 kg/ha/ano, resultando em uma queda nas exportações (RODRIGUES; BORBA, 2013). Desse modo, a maior parte da produção atual (93%) passou a ser absorvida pelo mercado interno (ROCHA, 2010). Tal retração ocorreu devido a infecções pelo vírus *Mionecrose infecciosa* (IMNV) que se espalhou muito rapidamente entre os produtores da região Nordeste (NATORI et al., 2011).

No Brasil, a prática da carcinicultura é regulamentada pela resolução 312/2002 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), um dos principais instrumentos que regem procedimentos para implantação e manutenção legal dessa atividade (BRASIL, 2002). Outros instrumentos legais também precisam ser observados, a exemplo do Decreto-Lei nº 24.348/34, que regula a saúde do animal e a eliminação de espécimes infectados, e o Decreto-Lei nº 986/69, que trata da segurança alimentar (RIBEIRO et al., 2014). Estes autores chamam a atenção de que o novo Código Florestal brasileiro (Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012) alterou diversas restrições de uso de algumas Áreas de Proteção Permanente (APPs), como apicuns, salgados, margens de rios e lagos, que agora podem ser utilizadas em atividades de carcinicultura, sendo este um dos pontos mais controversos da lei.

Na região Nordeste, algumas áreas de mangue têm sido completamente convertidas em viveiros de camarão. Na Paraíba, a principal área produtiva está implantada em terras indígenas da tribo dos Potiguaras no litoral norte do estado, onde existem 128 viveiros instalados segundo o plano de manejo do ICMbio (2014) em desacordo com a legislação ambiental vigente (BRASIL, 2005; SILVESTRE et al., 2011).

Além da degradação do manguezal, o despejo de efluentes da carcinicultura no momento de pós despesca tem alta concentração de material orgânico em suspensão e nutrientes (TANCREDO et al., 2012), bem como diversas substâncias químicas como antibióticos e agentes antimicrobianos, hormônios de crescimento e nutrientes (ANH et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2006), além de metais traços e mercúrio, que provocam efeitos deletérios sobre os ecossistemas e podem chegar ao homem. Alguns desses produtos estão associados a disfunções endócrinas em humanos (PRIMAVERA, 2006). A presença de nutrientes em

excesso na água de descarte usualmente provoca eutrofização e pode ocasionar o surgimento de florações de algas tóxicas (RIBEIRO et al., 2014; THOMAS et al., 2010), com desdobramentos imprevisíveis ao ambiente e à saúde pública.

A minimização de impactos ambientais da atividade de carcinicultura é um importante ponto que tem sido considerado nos sistemas produtivos desde a década de 90. Diminuir o descarte desses efluentes ou adequá-los a níveis de segurança ambiental adequados tem sido um importante propósito perseguido por diversos pesquisadores, incluindo o uso de macroalgas e de animais filtradores, como as ostras, na biorremediação e tratamento de efluentes (GUIMARÃES, 2008). Esses organismos podem remover tanto nutrientes como partículas em suspensão na água, melhorando assim a qualidade do efluente. Macroalgas são muito eficientes na remoção de nutrientes (JONES; DENNISON; PRESTON, 2001), podem reduzir a carga de amônia em até 67% em cultivos integrados com peixe e abalone (NEORI; SHPIGEL; BEN-EZRA, 2000), mas tem-se verificado que macroalgas se desenvolvem melhor quando integradas ao cultivo de peixes. Como elas absorvem nitrogênio e fósforo, sua contribuição à biorremediação torna-se eficaz, além de propiciar diversificação econômica da produção (MOURA; SOUZA-JÚNIOR; FARIAS, 2008).

Uma alternativa para minimizar os impactos do lançamento de efluentes da carcinicultura em corpos hídricos seria a utilização de bacias de sedimentação ou decantação e sistema de recirculação de água, como proposto pela resolução 312/2002 do CONAMA (BRASIL, 2002). Esta resolução propõe que esses sistemas devem ser construídos nas fazendas de camarão, porém, a grande maioria dos viveiros implantados na região Nordeste não possui bacia de sedimentação e não adota algum sistema de reuso de água (LEITÃO et al., 2011; TANCREDO et al., 2012). Em fazendas implantadas na região semiárida existe um componente adicional que é o conflito por água entre criadores de camarão, comunidades urbanas e irrigantes, visto que a carcinicultura representa a segunda maior atividade demandante por água. Segundo Sandu et al. (2002), o tratamento dos efluentes e o reuso da água na carcinicultura poderia reduzir as descargas finais em até 90%, resultando numa enorme economia de água. Assim, sistemas que integram o tratamento de efluentes e o reuso da água têm ganhado adeptos no mundo todo (LIN et al., 2003).

A biorremediação usando microalgas tem sido sugerida, mas ao que parece não tem sido muito estimulada especialmente porque o crescimento excessivo de microalgas promove variações diárias nos níveis de oxigênio dissolvido, pH e amônia, de sorte que o aumento excessivo da biomassa microalgal pode se tornar um problema quando não há um manejo adequado (BURFORD et al., 2003). O uso de sistemas heterotróficos com inoculação de

bactérias através de probióticos tem sido sugerido não somente com o fim de melhorar a qualidade da água, mas também visando aumentar a produtividade em fazendas de camarão (WASIELESKY et al., 2006), uma vez que os componentes orgânicos servem como fonte de energia e podem estar disponíveis tanto na coluna d'água quanto no fundo do viveiro. Mas reconhece-se que estes sistemas produzem maior quantidade de biomassa bacteriana em comparação aos cultivos autotróficos aumentando, em consequência, a quantidade de material em suspensão e dióxido de carbono na água, devido ao baixo consumo da alcalinidade como fonte de carbono, e a não produção de nitrito e nitrato (GUIMARÃES, 2008).

Ressalta-se, entretanto, que não se tem olhado por outro prisma a questão da utilização das microalgas na biorremediação desses efluentes. Microalgas estão no topo das pesquisas biotecnológicas em função de suas qualidades em produzir elevadas quantidades de biomassa em curto tempo e pelo fato de muitas espécies produzirem inúmeros produtos de interesse à produção de energia e bioprodutos para indústrias de alimentos, química fina e fármacos em geral. Logo, não restam dúvidas que neste contexto elas surgem como uma das alternativas potencialmente, biotecnologicamente e economicamente importantes na biorremediação de efluentes como os da carcinicultura. Diante deste contexto, este trabalho foi planejado, visando analisar a efetividade da utilização de microalgas na mitigação de impactos ambientais da carcinicultura, mediante o desenvolvimento de ensaios laboratoriais de cultivo de microalgas em efluentes dessa atividade.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO EFLUENTE DE CARCINICULTURA

A pesquisa foi desenvolvida utilizando água de fundo de um viveiro de camarão da aldeia indígena de Tramataia, litoral norte do estado da Paraíba, situado à margem do estuário do rio Mamanguape, coletada no dia 17 de dezembro de 2014, na fase de pós-despesca, em tambor de plástico de 60 L. O material foi transportado ao Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas da Universidade Federal da Paraíba (LARBIM/UFPB), onde a água foi clareada por filtrações sucessivas em filtro qualitativo e depois em filtro Whatmann GF/C, sendo em seguida autoclavada. Foram feitas medidas de salinidade (refratômetro portátil), pH (pH-metro de bancada), turbidez (sonda Hanna), condutividade elétrica (condutivímetro de bancada) e análises de nitrato, nitrito e fosfato (GRASHOFF, 1976).

### 5.2.2 POTENCIAL DE CRESCIMENTO DA DIATOMÁCEA MARINHA *Amphora* sp. EM ÁGUA DE CARCINICULTURA E EFETIVIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES

Este experimento foi desenvolvido em triplicatas, cultivando-se a espécie *Amphora* sp em meio Conway (controle) e em água de carcinicultura na concentração de 100% em frascos de 6 L de capacidade mantidos a  $25 \pm 1$  °C, iluminação de  $150 \mu\text{mol.fótons.m.s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 horas e aeração constante à pressão ambiente através de um minicompressor de membrana Resun AOC2 ( $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ). Esta espécie foi selecionada por apresentar valores de ácidos graxos superiores à soja (CALIXTO et al., 2016).

Os inóculos iniciais variaram de 5000 a 10000 células.mL<sup>-1</sup> e o acompanhamento dos cultivos foi feito por contagem celular em câmara de Fuchs-Rozenthal e medidas de peso seco (gravimetria) e foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa obtida (rendimento final em biomassa) foi concentrada em centrífuga refrigerada a 18 °C, congelada a -30 °C e liofilizada, sendo em seguida pesada em balança analítica. Simultaneamente foram determinados os valores de nitrato, nitrito e fosfato, segundo Grasshoff (1976) e realizadas medidas de pH e condutividade elétrica no frasco contendo água de carcinicultura, calculando-se em seguida a quantidade de nutrientes removidos (expressa em valores percentuais) nesse efluente.

As curvas de crescimento foram traçadas para as duas condições experimentais, comparando-se a velocidade de crescimento (k), o rendimento máximo em biomassa e o

rendimento em número de células. A partir dos dados da curva de crescimento foram calculados o rendimento máximo em número de células, a produtividade diária de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) e a velocidade de crescimento ( $k$ ) que se refere ao número de divisões celulares da espécie por unidade de tempo (dia), conforme proposto por Stein (1973).

### 5.2.3 MEDIDAS DE FISIOLOGIA CELULAR E METABOLISMO LIPÍDICO DE *Amphora* sp. NO FRASCO CONTROLE E EM ÁGUA DE CARCINICULTURA

As medições fisiológicas foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FASCcalibur (BD Biosciences, San Jose, CA USA). Os detectores utilizados nas análises de citometria de fluxo foram o FL1 (verde – 530nm), FL3 (vermelho – 670 nm), FSC (tamanho celular) e SSC (complexidade celular), e os parâmetros foram verificados com o *Flowing Software* versão 2.5. A fluorescência verde (FL1) foi utilizada para detectar o conteúdo lipídico e a fluorescência vermelha (FL3) para discriminar a clorofila das células, detectando, assim, a microalga. As células foram marcadas com BODIPY 493/503 (Difluoro {2- [1- (3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N) ethyl] -3,5-dimethyl-1 H-pyrrolato-N}boron-Molecular probes, Invitrogen) com concentração estoque (10 mM); concentração da solução de trabalho (10 mM); concentração final (10  $\mu\text{M}$ ), para a detecção do conteúdo lipídico intracelular e a incubação do marcador foi de 30 min, no máximo (LELONG; HEGARET; SOUDANT, 2011).

### 5.2.4 ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa *Statgraphics centurion* 17.1.03. A normalidade dos dados foi testada e as variações dos parâmetros analisados foram confirmados com o teste de homocedasticidade (Teste Levene). Os parâmetros lipídeos, concentração celular, FL3, FSC e SSC foram comparados pelo teste two-way ANOVA para observar a diferença entre o tempo (dias de cultivo) e as condições de cultivo. Um segundo teste estatístico foi realizado (one-way ANOVA) para verificar as diferenças entre os tratamentos em cada tempo. Para todas as análises foi considerado  $p < 0,05$  como nível de significância. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DO EFLUENTE DE CARCINICULTURA

A água de carcinicultura apresentou valores de pH de 7,78, salinidade de 34,8 psu, elevada turbidez, alta concentração de sólidos em suspensão e valores de nitrato superiores aos de fosfato (Tabela 5.1). Os valores de turbidez e sólidos totais são compatíveis com os valores registrados por Figueiredo et al. (2006), mas os valores de nitrato e fosfato são superiores.

Tabela 5.1. Parâmetros físico-químicos analisados na água de carcinicultura.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Temperatura	31,0
Salinidade	34,8 psu
Condutividade elétrica	34,8 mS cm <sup>-1</sup>
pH	7,78
Sólidos em suspensão	134,2
Turbidez	288 NTU
Nitrato	1,81 mg.L <sup>-1</sup>
Nitrito	0,003 mg.L <sup>-1</sup>
Fosfato	0,29 mg.L <sup>-1</sup>

### 5.3.2 CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES E PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE *Amphora* sp. EM MEIO CONWAY

A determinação de nitrato, nitrito e fosfato efetuadas no experimento com água de carcinicultura evidenciaram que após 20 dias de cultivo restavam ainda 26,643% de fosfato, 27,428% de nitrato e 33,333% de nitrito. Esses valores indicam, respectivamente, que houve uma remoção de 73,357%, 72,572% e 66,667% para PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub> e NO<sub>2</sub> denotando, assim, um potencial de agente mitigador nesse tipo de efluente pela microalga estudada (Tabela 5.2). A menor taxa de redução de nitrito indica que esta forma de nitrogênio é menos assimilada do que nitrato, e os acréscimos nas concentrações desse composto entre o 5º dia e o 15º dia indica a ação de processos desnitrificantes atuando durante o cultivo, provavelmente resultantes da ação de bactérias (PANIAGUA-MICHEL; GARCIA, 2003), pois o cultivo não era axênico.

Tabela 5.2. Valores brutos e porcentagem de remoção de fosfato, nitrato e nitrito do efluente de carcinicultura ao longo dos dias de cultivo.

Dias de cultivo	PO <sub>4</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	% remanescente	NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	% remanescente	NO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	% remanescente
1	0,289		1,812		0,003	
5	0,265	91,695	1,512	83,444	0,005	166,667
7	0,131	45,328	0,994	54,856	0,006	200,000
8	0,069	23,875	0,798	44,039	0,007	233,333
11	0,085	29,402	0,580	32,009	0,007	233,333
13	0,099	34,256	0,550	30,353	0,005	166,667
15	0,099	34,256	0,511	28,201	0,004	133,333
18	0,131	45,328	0,503	27,759	0,003	100,000
20	0,077	26,643	0,497	27,428	0,001	33,333

A efetividade de remoção de nutrientes por microalgas também já foi demonstrada com outros tipos de efluentes, incluindo efluentes têxteis (CHINNASAMY et al., 2010; LIM; CHU; PHANG, 2010). Além disso, alguns estudos foram realizados com tratamento biológico conjugado, usando consórcio de microrganismos (bactérias e microalgas) na aquicultura, a fim de incrementar a efetividade do processo de biorremediação desse tipo de efluente (PANIAGUA-MICHEL; GARCIA, 2003; TOI et al., 2014; VAN DEN HENDE et al., 2014).

*Amphora* sp apresentou grande eficácia na redução de fosfato, nitrato e nitrito da água de carcinicultura e como ela produz mais ácidos graxos do que a soja, sua utilização no tratamento deste tipo de efluente pode resultar em duplo interesse: minimização de impacto ambiental através de uma biorremediação mais efetiva e produção de substanciais quantidades de biomassa que poderia ser destinada à produção de energia. Alterações nas respostas fisiológicas através de variações da temperatura e da luminosidade dos cultivos, ou mediante a introdução na água de carcinicultura de nutrientes que aproximem os valores deste substrato ao meio controle, poderiam incrementar mais ainda a produção de biomassa desta espécie neste tipo de efluente, o que seria de grande interesse tecnológico.

Os impactos da carcinicultura devido à emissão de N e P em águas estuarinas é considerável, com valores surpreendentemente elevados de até 290 kg.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> como demonstrado por Jackson et al. (2003) e Burford et al. (2003) para a Austrália, e de até 112 kg.ha<sup>-1</sup>.ano<sup>-1</sup> como demonstrado por Paez-Osuna et al. (1999; 2003) no México. Remetidos ao Brasil, esses dados sugerem que grandes quantidades de N e P estão entrando nos estuários do Nordeste brasileiro a taxas crescentes, visto que as fazendas de camarão nessa região aumentaram, somente na última década, cerca de 20% por ano, devido às ótimas condições do clima regional (LACERDA et al., 2004). Entretanto, as diferenças regionais nas dimensões das

bacias hidrográficas indicam que as concentrações de N e P que são perdidas para os estuários por ano podem variar desde quantidades pequenas (da ordem de 9 tonN.ano<sup>-1</sup> e 0,7 tonP.ano<sup>-1</sup>) na bacia do Ceará-Mirim, que possui somente 30 ha de viveiros, até 485 tonN.ano<sup>-1</sup> e 35 tonP.ano<sup>-1</sup> na bacia do rio Açú, Rio Grande do Norte, que possui uma área total de 1.679 ha de viveiros (LACERDA, 2006). No geral, entretanto, as cargas de nitrogênio e fósforo oriundas da carcinicultura na região nordeste do Brasil são consideradas pequenas, exceto para os estuários do rio Jaguaribe (estado do Ceará) e Açú (Rio Grande do Norte), que possuem as maiores áreas ocupadas com viveiros, respectivamente de 1.260 ha e 1.680 ha (LACERDA, 2006). Mesmo assim é necessária muita atenção com essas emissões, pois esses nutrientes são rapidamente mobilizados no ambiente aquático, gerando possibilidades reais de promoverem eutrofização.

Os ensaios evidenciaram um crescimento considerável de *Amphora* sp. na água de carcinicultura, mas foi menor que 50% do rendimento máximo obtido no meio controle (Figura 5.1). Entretanto, o crescimento em água de carcinicultura foi mais rápido do que no meio completo, visto que o rendimento máximo de células nesse efluente foi alcançado, em média, entre os dias 15 e 16 após o início, enquanto que no meio completo foi no 18º/19º dia. O valor do k calculado entre o terceiro e o oitavo dia para o controle foi de 0,23 divisões celulares.dia<sup>-1</sup>, enquanto que para efluente de carcinicultura foi de 0,53 divisões celulares.dia<sup>-1</sup>.

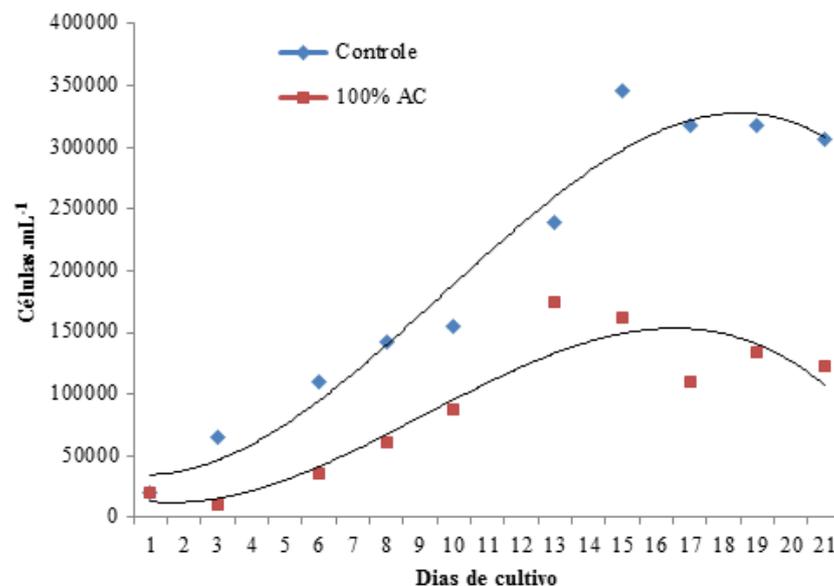


Figura 5.1. Curvas de crescimento da espécie *Amphora* sp. em meio padrão (Conway) e em água de carcinicultura a 100% em 21 dias de cultivo.

### 5.3.3 FISILOGIA CELULAR DE *Amphora* sp. DURANTE O CULTIVO EM ÁGUA DE CARCINICULTURA

As comparações das respostas fisiológicas relacionadas ao metabolismo lipídico de *Amphora* sp. (Figura 5.2) evidenciaram que há diferença significativa (ANOVA Two-way;  $F = 24,34$ ;  $p = 0,0000$ ) na síntese de lipídeo com relação ao tempo de cultivo no efluente de carcinicultura e no meio de cultura controle. Comparando os tratamentos com relação ao tempo houve diferença significativa apenas no 14º dia de cultivo (ANOVA One-way  $F = 20,42$ ;  $p = 0,0040$ ), demonstrando que o cultivo na água de carcinicultura apresentou valores na síntese de lipídeos mais elevados do que no cultivo controle. Este achado é extremamente relevante, visto que pode criar uma expectativa real de que o impacto ambiental das descargas dos efluentes gerados pelas fazendas de camarão pode agregar valor à cadeia produtiva do camarão pela produção de biomassa de microalgas que poderia ser disponibilizada à produção de biodiesel.

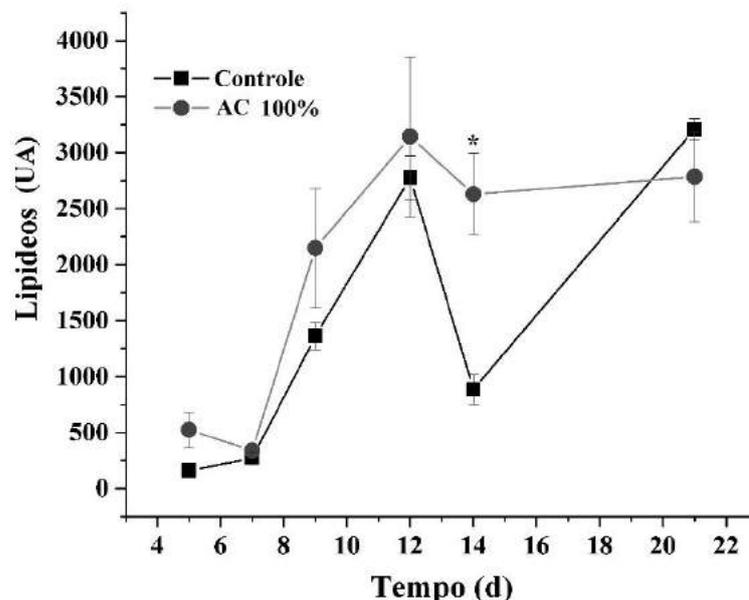


Figura 5.2. Comparação da curva de lipídeos da diatomácea *Amphora* sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivo (\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC 100% = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.

No tocante às concentrações celulares, os valores foram sempre superiores no meio controle (Figura 5.3), o teste estatístico evidenciou diferenças significativas (teste  $F = 6,63$ ;  $p = 0,0003$ ) entre o controle e a água de carcinicultura. Comparando os tratamentos com relação ao tempo não houve diferença significativa apenas no 7º ( $F = 3,36$ ;  $p = 0,1166$ ) e 12º ( $F = 4,49$ ;  $p$

= 0,0669) dia de cultivo.

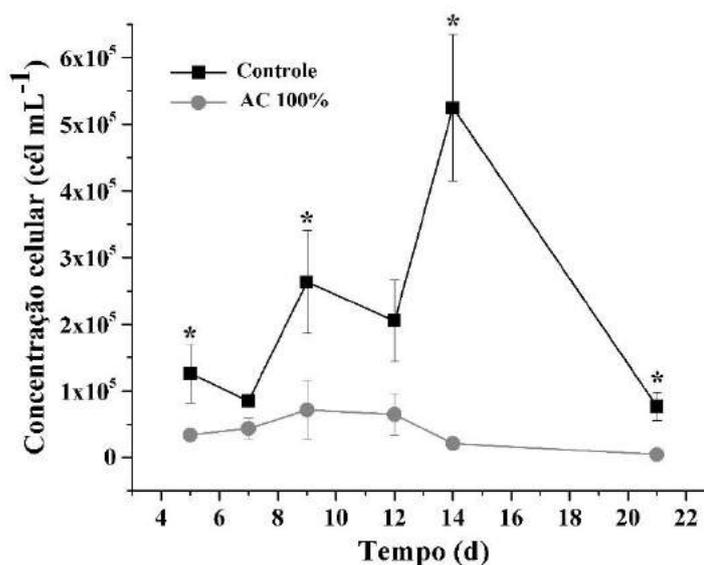


Figura 5.3. Curvas da concentração celular da diatomácea *Amphora* sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivo (\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC 100% = Água de camarão a 100%.

As análises das duas variáveis acima evidenciam que uma menor quantidade de células de *Amphora* sp cultivada no efluente de carcinicultura (Figura 5.3) produz comparativamente mais quantidades de lipídeos do que altas densidades celulares cultivadas no meio controle (Figura 5.2). Este achado é surpreendente, pois ao tempo em que esta espécie reduz as concentrações de nitrato e fosfato deste tipo de efluente, sintetiza mais lipídeos que poderiam ser utilizados para a produção de biodiesel, por exemplo, do que as quantidades produzidas em meio sintético. Além disso, a quantidade de nitrato e fosfato no efluente de carcinicultura é consideravelmente menor em comparação com o meio controle e segundo Chu et al. (2014) e Liang et al. (2012), a deficiência de nitrogênio e fósforo no meio, afeta severamente a síntese de proteínas resultando em um fluxo metabólico no sentido de biossíntese lipídica, e com isso pode haver maior acumulação de lipídeos (COURCHESNE et al., 2009).

Por outro lado, as análises de fluorescência da clorofila (Figura 5.4) evidenciaram valores mais elevados no meio controle, muito embora os valores registrados no efluente de carcinicultura foram expressivos, com tendência a aumentarem a partir do 14º dia de cultivo. Ho et al. (2014) descrevem em sua pesquisa que as quantidades de nitrogênio também interferem diretamente nas taxas fotossintéticas. A análise de variância efetuada para este parâmetro demonstrou que os valores de FL3 diferem estatisticamente ao nível de confiança de 5% ( $F = 5,83$ ;  $p = 0,0005$ ), com os valores do meio controle mais elevados.

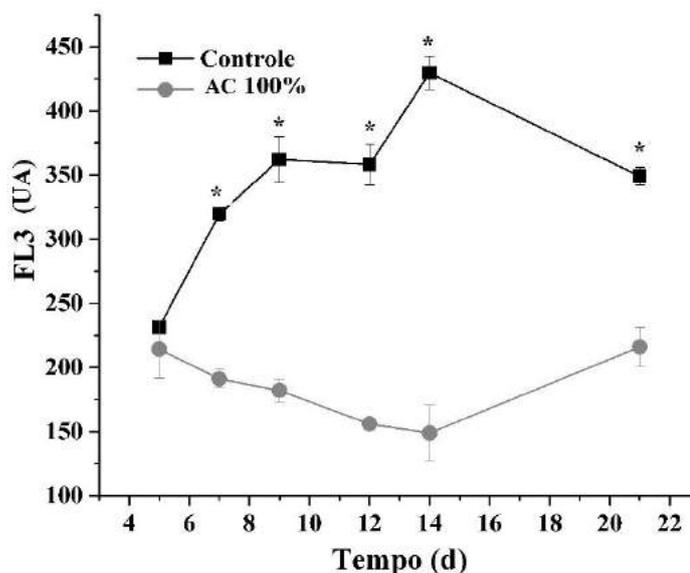


Figura 5.4. Curvas da fluorescência da clorofila (FL3) da microalga *Amphora* sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivos. (\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC = Água de camarão da 100%; UA = Unidade arbitrária.

As análises estatísticas do tamanho celular (FSC) medido por citometria de fluxo (Figura 5.5) evidenciaram que há diferença significativa no tamanho celular da *Amphora* sp. ao longo da curva de crescimento (ANOVA Two-way;  $F = 6,28$ ;  $p = 0,0003$ ) entre as duas condições testadas. Comparando os tratamentos com relação ao tempo houve diferença significativa apenas no 12º dia de cultivo (ANOVA One-way;  $F = 7,72$ ;  $p = 0,0321$ ). Essa redução do tamanho celular no cultivo com água de camarão pode estar associado à osmose celular que tem relação direta com a quantidade de solutos presentes no meio, mas nenhum dado na literatura sobre respostas fisiológicas da variação do tamanho celular para experimentos semelhantes foi encontrado.

A análise de variância da complexidade celular (SSC) (Figura 5.6) evidenciaram valores muito mais elevados para esse parâmetro no efluente de carcinicultura em todos os dias da curva de crescimento, sugerindo que a complexidade celular é aumentada intracelularmente nas células da *Amphora* sp. tornando este parâmetro um marcador potencial para o estado fisiológico de uma célula. Muitas vezes a complexidade pode ser identificada pela acumulação de moléculas de armazenamento, tais como amido, lípidos neutros e  $\beta$ -caroteno, o que resulta em uma estrutura celular interna mais complexa, como observado por Fachel et al. (2016) em ensaios realizados com *Dunaliella salina*. Como a complexidade celular está relacionada com a presença de células lipídicas, como visto acima, o ensaio com água de camarão evidenciou uma maior produção de lipídeos, indicando que as células cultivadas em efluente de carcinicultura apresentaram estrutura interna mais complexa do que em meio padrão. As observações

evidenciaram que há um efeito estatisticamente significativo sobre a complexidade celular ao nível de confiança de 95% ( $F = 6,02$ ;  $p = 0,0004$ ). Comparando-se os tratamentos com relação ao tempo evidenciou-se diferença significativa no 5°, 12°, 14° e 21° dia de cultivo ( $F = 19,26$ ;  $p = 0,0046$ ;  $F = 7,29$ ;  $p = 0,0356$ ;  $F = 132,30$ ;  $p = 0,0000$  e  $F = 12,54$ ;  $p = 0,0122$ , respectivamente).

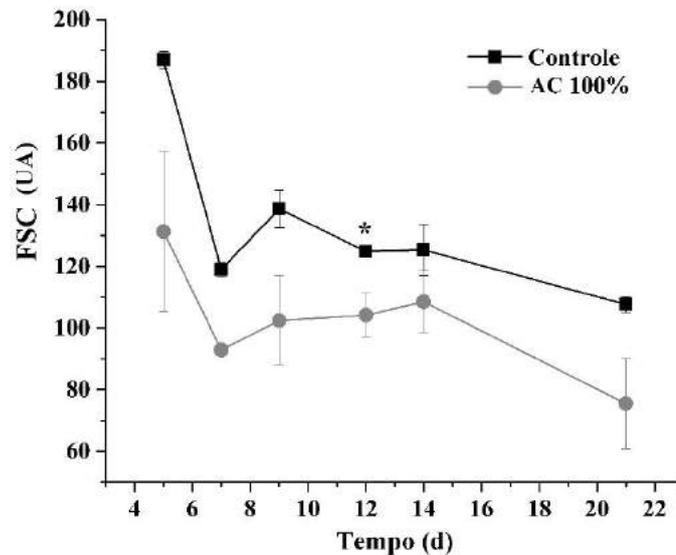


Figura 5.5. Comparação do tamanho celular (FSC) da diatomácea *Amphora* sp cultivada em meio controle (Conway) e água de camarão a 100% em 21 dias de cultivos. (\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos no tempo indicado). AC = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.

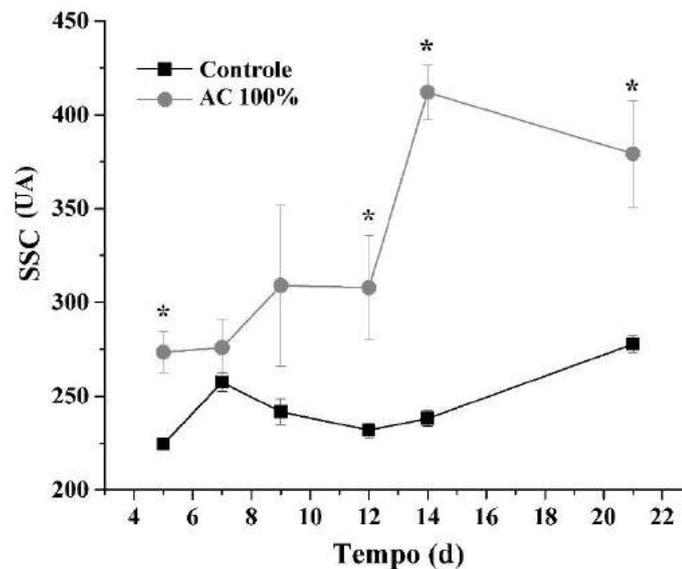


Figura 5.6. Complexidade celular (SSC) da diatomácea *Amphora* sp entre o cultivo no meio controle (Conway) e na água de camarão a 100% em 21 dias. (\* indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos nos tempos indicados). AC = Água de camarão a 100%; UA = Unidade arbitrária.

## 5.4 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra a efetividade da remoção de nutrientes presente no efluente de carcinicultura através da utilização da microalga *Amphora* sp. O uso de microalgas no tratamento de efluentes oriundo de atividades antropícas tem recebido bastante atenção, mas atualmente há poucos trabalhos que relatam o uso de microalgas na biorremediação de efluentes de carcinicultura. Nosso estudo demonstrou que *Amphora* sp apresenta um bom potencial de crescimento, removendo em torno de 70% as concentrações de nitrato, nitrito e fosfato do meio em 21 dias e também demonstrou nas condições experimentais testadas, que a microalga apresenta elevado potencial de síntese de lipídeos, denotando esses dados uma possibilidade real de dar a este tipo de tratamento uma aplicação comercial, gerando biomassa rica em lipídeos que pode ser utilizada para outras finalidades, inclusive produção de energia.

## REFERÊNCIAS

ABCC. Código de Conduta e de Boas Práticas de Manejo para uma Carcinicultura Ambientalmente Sustentável e Socialmente Responsável. 2 ed., 18p., ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Recife, PE, Brasil, 2004.

ANH, P.T.; KROEZE, C.; BUSH, S.R.; MOL, A.P.J. Water pollution intensive brackish shrimp in south-east Vietnam: Causes and options for control. **Agricultural Water Management**, v. 9, n. 6, p. 872-882, 2010.

APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, **Water Environmental Federation**, 20<sup>th</sup> ed. Washington, 1998.

BRASIL. Resolução CONAMA n. 312 de 10 de outubro de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de áreas de preservação permanente. **Diário Oficial da União**, n.224, s.1, p.92-95, 2002.

BRASIL. Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Relatório final**. Brasília, DF, 2005. 105p.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; McINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSON, D. C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize Aquaculture, v. 219, p. 393-411, 2003.

CALIXTO, C.D.; SASSI, C.F.C.; SASSI, R.; CONCEIÇÃO, M.M. Bioprospecção de microalgas isoladas do Nordeste brasileiro quanto à potencialidade para a produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2016. (Artigo para submissão).

CASTRO, A.A.; PAGANI, G.D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 123- 129, 2004.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v.101, n. 9, p.3097-3105, 2010.

CHU, F-F.; CHU, P-N.; SHEN, X-F.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 241-246, 2014.

COURCHESNE, N.M.D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN.; C.Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31–41, 2009.

DERNER, R. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* E *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos

graxos poliinsaturados. **Tese de doutoramento**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 140p, 2006.

EJF. Smash & Grab: Conflict, Corruption and Human Rights Abuses in the Shrimp Farming Industry. **Environmental Justice Foundation**, London, UK. 33p., 2003

FACHET, M.; HERMSDORF, D.; RIHKO-STRUCKMANN, L.; SUNDMACHER, K. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. **Algal Research**, v. 13, p. 227-234, 2016.

FIGUEIREDO, M. C. B.; ARAÚJO, L F. P.; ROSA, M. F.; MORAIS, L. F. S.; PAULINO, W. D.; GOMES, R. B. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura de águas interiores. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11,p.231-240, 2006.

GRASSHOFF, K. (Ed.). Methods of seawater analysis. Verlag Chemie: Weinheim. ISBN 3-527-25631-8. XIV, p. 317, 1976.

GUIMARÃES, I.M. Utilização de ostra e macroalga como biofiltro para efluentes de cultivo de camarão marinho. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

HO, S.H.; CHAN, M.C.; LIU, C.C.; CHEN, C.Y.; LEE, W.L.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 275–282, 2014.

ICMBio. Plano de Manejo: APA da Barra do Rio Mamanguape; ARIE de Manguezais da Foz do Rio Mamanguape, Brasília, 2014.

JACKSON, C.; PRESTON, N.P.; THOMPSON, P.; BURFORD, M. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. **Aquaculture**, V. 218, p. 397-411, 2003.

JONES, A. B.; DENNISON, W. C.; PRESTON, N. P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. **Aquaculture**, v. 193, p. 155-178, 2001

JORRY, D. Status, Issues and Perspectives of the Global Shrimp Farming Industry: Opportunities for U.S. Shrimp Producers. Indiana Indoor Shrimp Production Brainstorming Session, Indiana Soybean Alliance, Indianapolis. **Commercial Aquaculture**, 2014.

LACERDA, L. D. Inputs of nitrogen and phosphorus to estuaries of northeastern Brazil from intensive shrimp farming. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 13-27, 2006.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V.; VAISMAN, A. G.; MAIA, S. R. R.; AGUIAR, J. E.; DIAS, F. J. S. Contaminação dos metais pesados nas bacias inferiores dos rios Curimatau e Açú (RN) e rio Jaguaribe (CE) In: Impacto do ambiente Exógeno sobre a Carcinicultura Marinha. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC), Sociedade Internacional para Ecossistemas de Manguezal (ISME-BR). Fortaleza, 2004.

LEITÃO, R.C.; CAVALCANTE, R.R.R.; RIBEIRO, E.M., CLAUDINO, R.L., MACIEL, N.M.; ROSA, M.F. Reuso da água da despesca na produção de camarão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.15, n.12, p.1314–1320, 2011.

LELONG, A.; HEGARET, H.; SOUDANT, P. Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-nitzschia multiseries*, a toxic diatom. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 969-981, 2011

LIANG, K.; ZHANG, Q.; GU, M.; CONG, W. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. **Journal Applied of Phycology**, v. 25, p. 311-318, 2012.

LIM, S.; CHU, W.; PHANG, S. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. **Journal Bioresource of Technology**, v. 101, p. 7314–7322, 2010.

LIN, Y. F.; JING, S. R.; LEE, D. Y. The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture. **Environmental Pollution**, v.123, p.107-113, 2003.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MOURA, R. N.; SOUZA JÚNIOR, J.; FARIAS, W. R. L. Reutilização de água em um sistema integrado com camarões, sedimentação, ostras e macroalgas marinhas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 4, p. 540-547, 2008.

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.Brasil, MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura Brasília, DF, Brasil, 2011.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B. DOS.; PREVIERO, T. DE C.; VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A.H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas** v.41, n. 2. P. 61-73, 2011.

NEORI, A.; SHPIGEL, M.; BEN-EZRA, D. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. **Aquaculture**, v. 186, p. 279-291, 2000.

NÓBREGA, G.N.; FERREIRA, T.O.; ROMERO, R.E.; MARQUES, A.G.B.; OTERO, X.L. Iron and sulfur geochemistry in semi-arid mangrove soils (Ceará, Brazil) in relation to seasonal changes and shrimp farming effluents. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 9, p7393–7407, 2013.

PÁEZ-OSUNA, F.; GRACIA, A.; FLORES-VERDUGO, F.; LYLEFRITCH, L.P.; ALONSO-RODRÍGUEZ, R.; ROQUE, A.; RUIZFERNÁNDEZ, A.C. 2003. Shrimp aquaculture and the environment in the Gulf of California ecoregion. 806-815, 2003.

PÁEZ-OSUNA, F.; GUERRERO-GALVÁN, S.R.; RUIZFERNÁNDEZ, A.C. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the Gulf of California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p.585-592, 1999.

PANIAGUA-MICHEL, J.; GARCIA, O. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluente using constructed microbial mats. **Aquaculture Engineering**, v. 28, n. 3-4, p. 131-139, 2003.

PINDICH, R., RUBENFELD, D. **Econometric models and economic forecasts**. 2 ed. New York: Mc Graw-Hill, 492 p, 1981.

PRIMAVERA, J.H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean and Coastal Management**, v. 49, n. 9, p. 531–545, 2006.

RIBEIRO, L. F.; SOUZA, M. M.; BARROS, F.; HATJE, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Journal of integrated coastal zone management**, v. 14, n. 3, p. 365-383, 2014.

ROCHA, I. P. Shrimp Farming In Brazil Burgeoning Industry Recovering, Future Holds Potential. **Global aquaculture advocate**, p: 43-45, 2010

RODRIGUES, J.; BORBA, M. Carcinicultura Brasileira: Estatísticas e Revelações, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2013.

SANDU, S. I.; BOARDMAN, G. D.; WATTENC, B. J.; BRAZIL, B. L. Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filters with a plastic beans medium. **Aquacultural Engineering**, v.26, p.41-59, 2002.

SILVESTRE, L.C.; FARIAS, D.L.S.; LOURENÇO, J.D.S.; BARROS, S.C.A.; BRAGA, N.M.P. Diagnóstico dos impactos ambientais advindo de atividades antrópicas na APA da barra do Rio Mamanguape. **Enciclopédia Biosfera, Centro Conhecer Científico**, v. 7, n. 12, 2011.

STEIN, J.R. (ed.). Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University, p. 448, 1973.

TANCREDO, K.R.; NOBREGA, T.O.; DIAS, T.; LAPA, K.R. Impactos Ambientais da Carcinicultura Brasileira. **3rd International Workshop Advances in Cleaner Production**, São Paulo, May, p. 1-7, 2012.

THOMAS, Y.; COURTIES, C.; EL HELWE, Y.; HERBLAND, A.; LEMONNIER, H. Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, v. 61, p. 387–398, 2010

TOI, H. T.; BOECHX, P.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V. Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in Artemia as compared to mono-diets, as demonstrated by a <sup>15</sup>N isotope uptake laboratory study, **Aquaculture**, v. 422-423, p. 109-114, 2014.

VALDERRAMA, D.; ANDERSON, J. L. Shrimp Production Review. **Global Outlook Aquaculture LeaderShip**. Santiago, 2011.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; BOREEN, G.; BOON, N.; VERVAEREN, H. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 342-354, 2014.

WASIELESKY, W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C. L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.

## **CAPÍTULO 6**

**ARTIGO: POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE *Monoraphidim contortum* E  
CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM ÁGUA DE DRENAGEM  
AGRÍCOLA**

## POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE *Monoraphidium contortum* E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA

### RESUMO

Atualmente, as práticas agrícolas têm causado diversos impactos, como redução da produtividade nas áreas de cultivo e gerando problemas, consequentes de processos dinâmicos e difusos que podem se espargir por áreas muito distantes dos locais de cultivo, a exemplo da sedimentação de reservatórios, alterações nas bacias hidrográficas e emissões de dióxido de carbono, além do uso de pesticidas e fertilizantes. Os fertilizantes químicos, são geralmente utilizados em grandes quantidades e causam sérios problemas ambientais quando entram nos ambientes terrestres e aquáticos. As quantidades excedentes de nutrientes utilizados nas práticas agrícolas são carreadas para os sistemas aquáticos por drenagem terrestre, provocando a eutrofização. Neste trabalho, procurou-se utilizar água de drenagem agrícola (ADA) como meio alternativo para o cultivo de microalgas. Os ensaios foram realizados com efluente coletado em dezembro de 2015 na Mata do Garapu, município do Conde (PB). Primeiramente, 11 espécies de microalgas foram testadas neste tipo de efluente avaliando-se sua capacidade de crescimento. Duas delas *Synechocystis* sp e *Monoraphidium contortum* apresentaram melhor desenvolvimento neste tipo de efluente. Na segunda etapa dos ensaios, a *Monoraphidium contortum* foi selecionada por apresentar o segundo maior teor de ácidos graxos. Os experimentos foram realizados em triplicata, usando o meio WC como controle e ADA na concentração de 100%. Análises físico-químicas da ADA mostraram concentrações de NO<sub>2</sub> (1,62 mg/L) e PO<sub>4</sub> (18,21mg/L) e pH em torno de 7,2. Nas condições testadas, a *Monoraphidium contortum* mostrou um crescimento considerável no efluente, porém inferior ao registrado no meio controle. A microalga foi capaz de remover aproximadamente 73% de nitrato e 100% do fosfato, após 11 dias de cultivo. As comparações das respostas fisiológicas efetuadas por citometria de fluxo demonstraram concentrações celulares, fluorescência da clorofila e atividade da esterase mais elevadas no meio controle, mas proporcionalmente uma maior produção de lipídeos no efluente ADA.

**Palavras-chave:** Meio alternativo, Biorremediação, Citometria de fluxo, *M. contortum*.

## ABSTRACT

Actually, agricultural practices have caused many impacts such as reduced productivity in the growing and causing problems, resulting dynamic and diffuse processes that can distributed in areas far away from local cultivation, like the sedimentation of reservoirs, changes in watersheds and carbon dioxide emissions, and the use of pesticides and fertilizers. Chemical fertilizers are generally used in large quantities and cause serious environmental problems when they enter the terrestrial and aquatic environments. Nutrient excess amounts used in agricultural practices are carried to aquatic systems by land drainage, causing eutrophication. In this work, was used agricultural drainage water (ADA) as an alternative medium for the cultivation of microalgae. The tests were performed with effluent collected in December 2015 in the Forest of Garapu, Conde (PB). First, 11 species of microalgae were tested in this type of effluent evaluating its capacity for growth. The *Synechocistis* sp and *Monoraphidium contortum* showed better development in this kind of effluent. In the second stage of the tests, the *Monoraphidium contortum* was selected to present the second highest content of fatty acids. The experiments were performed in triplicate using the WC medium as control and ADA in 100% concentration. Physicochemical analysis showed in ADA, NO<sub>3</sub> concentrations (1.62 mg/L) and PO<sub>4</sub> (18,21mg/L) and pH around 7.2. Under the conditions tested, the *Monoraphidium contortum* showed considerable growth in the effluent, but lower than in the control medium. Comparisons of physiological responses effected by flow cytometry showed cell concentrations, chlorophyll flowering and higher esterase activity in the control medium but proportionally increased production of lipids in the effluent.

**Keywords:** Alternative médium, Bioremediation, Flow cytometer, *M. contortum*.

## 6.1 INTRODUÇÃO

O atual modelo de produção agrícola tem provocado sérias disrupturas no meio natural, diminuindo a produtividade das áreas cultivadas e gerando problemas que podem se distribuir por áreas muito distantes dos locais de cultivo, conseqüentes de processos dinâmicos e difusos, a exemplo da sedimentação de reservatórios, alterações nas bacias hidrográficas e emissões de dióxido de carbono (SHELDRICK et al., 2002). Além da mecanização, que provoca compactação dos solos, as práticas agrícolas atualmente em uso são largamente dependentes de pesticidas e fertilizantes, cada vez mais necessários para produzir quantidades crescentes de alimento.

A área total de terras aráveis e com culturas permanentes ultrapassa 1,5 bilhões de ha, representando este valor 12% da área terrestre do mundo (FAO, 2013). Desse total, 62% localizam-se nas regiões tropicais e subtropicais (MEA, 2005). A agricultura de sequeiro responde por 80% das áreas mundiais cultivadas e produz 60% dos alimentos do mundo, enquanto a agricultura irrigada produz 40% dos alimentos do mundo em apenas 18% de área plantada (BONFILS; LOBEL, 2007; KHAN; HANJRA, 2009; ROCKSTROM et al., 2007).

A agricultura irrigada expandiu cerca de 480% nos últimos séculos, devendo crescer mais 20% até 2030. Práticas de irrigação ocorrem em 174 dos 225 países, e a área global irrigada é de 2.571.753 km<sup>2</sup> (FAO, 2003). Seu impacto sobre os recursos hídricos é considerável, visto que cerca de 70% da retirada de água global e 85% do uso consuntivo da água destinam-se para a irrigação (DÖLL; SIEBERT, 1999).

Quase 3/4 das áreas irrigadas encontram-se nos países em desenvolvimento, suportando 60% da produção de arroz e 40% de trigo do mundo. Certamente a agricultura irrigada trouxe enormes benefícios para bilhões de pessoas pobres (NARAYANAMOORTHY; HANJRA, 2006). Através dela foi possível incrementar a produção e a produtividade e obter ganhos significativos com segurança alimentar e desenvolvimento rural. Também foi possível oferecer mais produtos para os pobres das zonas rurais e urbanas a menores preços, oferecer melhor nutrição e saúde à população, e melhorar condições de educação e de acesso à infraestrutura no meio rural, possibilitando melhorias nas condições de emprego e renda (HUSSAIN; HANJRA, 2003; 2004).

Entretanto, todo esse esforço tem deteriorado as capacidades dos ecossistemas de fornecer bens e serviços vitais, e já está afetando o potencial de produção de importantes alimentos e a tendência aos impactos negativos sobre a segurança alimentar é evidente,

particularmente nos países em desenvolvimento (FAO, 2011).

Entretanto, este cenário não se relaciona apenas com o uso de água. Ele é fortemente dependente de subsídios químicos e os pesticidas não são os únicos vilões (MATAMOROS; RODRIGUEZ, 2016; TURRAL; BURKE, 2010). Os fertilizantes químicos, cada vez mais necessários e em maiores quantidades, causam sérios problemas quando entram nos ambientes terrestres e aquáticos (CARPENTER et al. 1998, SHELDRIK et al., 2002).

As quantidades excedentes de nutrientes utilizados nas práticas agrícolas são carregadas para os sistemas aquáticos por drenagem terrestre (HARMEL et al., 2008) e lixiviação (ISIDORO et al., 2006; OENEMA et al., 2005; RANDALL et al., 2008), contaminando as águas superficiais e subterrâneas, e podendo chegar aos estuários e ecossistemas marinhos costeiros.

A eutrofização conseqüente restringe o uso da água para a pesca, recreação e indústria, devido ao aumento do crescimento de algas indesejáveis e plantas aquáticas, e falta de oxigênio decorrente da morte e decomposição desses organismos (SHARPLEY et al., 2006). Muitos reservatórios superficiais de água para abastecimento público têm apresentado florações periódicas de algas tóxicas (especialmente cianobactérias), que resultam na morte de peixes e trazem sérias conseqüências à saúde humana. Nessas condições também há alterações organolépticas e formação de agentes carcinogênicos durante o processo de cloração da água (KOTAK et al., 1993, LIU et al., 2011; TILLNER et al., 2013).

O excesso de nitrogênio e fósforo que chegar aos estuários e ecossistemas marinhos promove a degradação de habitats e perdas da biodiversidade (HOWARTH, 2008), mudanças nas cadeias tróficas e alterações nos ciclos biológicos, bem como na produtividade pesqueira. Além disso, N e P aumentam a morbidade e a mortalidade da fauna aquática, provocando extinção de espécies (CORRELL, 1998; TILMAN et al., 2001).

A região costeira do Nordeste do Brasil caracteriza-se por apresentar solos predominantemente arenosos, quartzosos, distróficos, do tipo quartzarênico, associados com latossolos e podzólicos amarelos e vermelhos, com pequenos trechos de solos aluvionais eutróficos ao longo de vales de rios (SILVA, 1996). Esses solos usualmente são ácidos e pobres, havendo necessidade constante de adubação a fim de garantir a produtividade agrícola. A escassez de cobertura vegetal na área, conseqüente à degradação da mata atlântica costeira na maior parte do território, associada à práticas agrícolas inadequadas, com queimadas sucessivas e mecanização, acabam por piorar a situação, resultando em perda de fertilidade e perda de solo arável.

As práticas agrícolas da região costeira do Nordeste baseiam-se, principalmente, na

plantação de hortifrútiis para atender os mercados locais, usualmente desenvolvidas por pequenos produtores rurais, somadas às extensivas plantações de cana-de-açúcar destinadas à produção de açúcar e álcool. As correções do solo são feitas usualmente com distintas formulações de N, P e K, dependendo do tipo de cultivar, bem como é frequente a utilização de esterco de galinha como suplemento mineral e orgânico, sendo o uso de irrigação muito comum na região. Tal prática ocasiona um crescente aumento na perda de nutrientes, principalmente quando se utilizam processos que resultam em elevado escoamento superficial, ou durante o período chuvoso.

A falta de assistência técnica adequada aos agricultores, e a prática de efetuar plantios em vertentes, faz com que parte desses insumos seja carreada atingindo os mananciais, onde são incorporados no circuito biológico ou são carregados pelos rios atingindo o mar. O processo de nutrificação costeira nessa região é bastante expressivo, atingindo áreas de reprodução de espécies e de *hotspots* de biodiversidade, como os estuários e os recifes costeiros. Áreas urbanas situadas próximas à costa intensificam este processo através do lançamento de esgotos domésticos e industriais (COSTA et al., 2008).

Minimizar este efeito torna-se assim uma decisão importante. Dado que esta mudança tende ser gradual, o atual sistema de produção agrícola para formas mais sustentáveis como a agricultura orgânica, por exemplo, o uso de microalgas como agente mitigador pode ser uma forma efetiva para a melhoria da qualidade ambiental e a manutenção de importantes serviços ecossistêmicos.

Microalgas crescem profusamente em meios inorgânicos, de maneira que o desenvolvimento de cultivos em água de drenagem agrícola poderá remover substanciais quantidades de nitrogênio e fósforo da água. Neste trabalho, procurou-se testar esta hipótese, utilizando-se água de drenagem agrícola oriunda de locais onde é praticada tradicionalmente agricultura de hortifrútiis para o comércio local, no litoral sul do estado da Paraíba, como meio alternativo para o cultivo de microalgas.

## 6.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.2.1 COLETA DE ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA, PROCEDIMENTO DE CLAREAMENTO E ANÁLISES QUÍMICAS

A água de drenagem agrícola foi coletada na localidade de Mata de Garapu, município do Conde, litoral sul do estado da Paraíba, em local onde são cultivados produtos como inhame, macaxeira, milho, feijão, batata-doce, mamão, maracujá, banana e abacaxi. Nessa localidade foram coletados 60 litros de água de drenagem agrícola no mês de dezembro de 2015, época das primeiras chuvas.

As amostras foram levadas ao laboratório e foram clareadas sequencialmente, usando inicialmente macerado de sementes de *Moringa oleífera* na proporção de 1 g.L<sup>-1</sup>, seguido de filtração em papel filtro qualitativo e filtração a vácuo em filtro de fibra de vidro Whatmann, GF/C e esterilizado com autoclave. O material assim tratado foi utilizado nos ensaios laboratoriais com culturas de microalgas. O pH da água foi determinado com pH-metro de bancada e os teores de nitrato e fosfato segundo o Standard Methods (APHA, 1998).

### 6.2.2 SELEÇÃO DE ESPÉCIES DE MICROALGAS E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA

Um total de 11 espécies de microalgas dulcícolas isoladas de vários mananciais regionais (Tabela 6.1) foi selecionado do banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB), dentre as quais duas apresentam valores de ácidos graxos superiores à soja (D121WC e D173WC), e uma (D174WC) apresenta valores próximos à soja, apresentando, portanto, potencialidade para produção de biodiesel. Dentre elas nove vêm sendo mantidas em meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972) e duas em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Essas espécies foram inoculadas em água de drenagem agrícola na concentração de 100%, em balões de 250 mL, em triplicatas, visando determinar quais apresentam melhores respostas de crescimento nesse efluente. O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por medidas da fluorescência *in vivo*, sendo interrompidos no início fase estacionária. Todas as curvas obtidas nos experimentos foram ajustadas com o programa estatístico CurveExpert (versão 1.3) pela aproximação à curva logística, conforme Pindich; Rubinfeld (1981) e segundo Derner (2006).

Tabela 6.1. Espécies de microalgas utilizadas nas análises de ácidos graxos e cujo crescimento foi testado em água de drenagem agrícola na concentração de 100%.

Cepa	Espécie	Procedência	Teor de ácido graxo (mg g <sup>-1</sup> )
D121WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Frei Martinho – PB	584,9
D173WC	<i>Monoraphidium contortum</i>	Lagoa Tapada – PB	267,9
D174WC	<i>Cosmarium</i> sp.	Açude Itapororoca – PB	215,9
D77WC	Clorofícea não identificada	João Pessoa – PB	181,9
D128WC	<i>Lagerheimia longiseta</i>	Balneário Pitimbú – PB	145,5
D124WC	<i>Ankistrodesmus</i> sp.	Açude Frei Martinho – PB	142,4
D125WC	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Balneário Pitimbú – PB	130,3
D109Z	<i>Synechococcus nidulans</i>	Nascente Grau – PB	117,4
D137WC	<i>Pediastrum tetras</i>	Açude São Anastácio – CE	117,4
D139WC	<i>Synechocystis</i> sp.	Lago Hotel Village – PE	106,3
D136Z	<i>Chlorococcum</i> sp.	Frei Martinho – PB	91,7

### 6.2.3 CULTIVO DE *Monoraphidium contortum* EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA E REMOÇÃO DE NUTRIENTES

A microalga *Monoraphidium contortum* foi selecionada como organismo teste por produzir um total de ácidos graxos superior à soja e por crescer muito bem em água de drenagem agrícola. Os cultivos desta espécie foram desenvolvidos em triplicata em meio WC (controle) e em água de drenagem agrícola na concentração de 100%, em balões de 6L de capacidade, em câmara de cultivo a 25°C, sistema de iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz-dia (150  $\mu\text{mol}\cdot\text{fótons}$ ) e fotoperíodo ajustado para 12 horas.

O desenvolvimento dos cultivos foi acompanhado por meio de contagens celulares em câmaras de Fuchs Rozenthal e por medidas da fluorescência *in vivo*. Os experimentos foram interrompidos na fase estacionária. A biomassa produzida ao final dos experimentos ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foi concentrada em centrífuga refrigerada a 18°C, congelada em ultrafreezer (-30°C), liofilizada e pesada em balança analítica. As curvas de crescimento obtidas foram ajustadas conforme descrito no item 6.2.2.

### 6.2.4 ASPECTOS FISIOLÓGICOS E METABOLISMO LIPÍDICO DE *Monoraphidium contortum* CULTIVADA EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA NA CONCENTRAÇÃO DE 100%

Para medidas de fisiologia celular e metabolismo lipídico de *M. contortum* a água de drenagem agrícola passou pelos processos de clareamento descrito em 6.2.1 s e também foi

filtrada em sistema estéril, em membrana Millipore® de 0,22 µm. As medições fisiológicas foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo FASCcalibur (BD Biosciences, San Jose, USA). As análises foram feitas em três períodos de acordo com a curva de crescimento (final da fase lag, fase log e estacionária). Os detectores utilizados nas análises de citometria de fluxo foram o FL1 (verde – 530nm), FL3 (vermelho – 670 nm), FSC (tamanho celular) e SSC (complexidade celular), e os parâmetros foram verificados com o Flowing Software versão 2.5. A fluorescência verde (FL1) foi utilizada para detectar o conteúdo lipídico da célula bem como atividade da esterase e viabilidade celular, e a fluorescência vermelha (FL3) para discriminar a clorofila das células, detectando, assim, a microalga.

As células foram marcadas com BODIPY 493/503 (Difluoro{2-[1-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene-N)ethyl]-3,5-dimethyl-1H-pyrrolato-N}boronMolecular Probes, Invitrogen), com concentração estoque de 10 mM, concentração da solução de trabalho de 10 mM e concentração final de 10 µM para a detecção dos lipídeos neutros, com SybrGreen I (Invitrogen) com concentração estoque de 10<sup>-2</sup> do original que é 10.000x com concentração final de 10<sup>-4</sup>, para verificar a contaminação por bactérias e com FDA (diacetato de fluoresceína) (Sigma F1303) com concentração estoque de 5 mg/ml ou 12 mM, concentração da solução de trabalho e concentração final de 3 µM para a observação da atividade da esterase e viabilidade celular. As células viáveis foram determinadas pelo FCM como a percentagem de células coradas por diacetato de fluoresceína (FDA, i.e. esterase de células ativas em relação a células totais). Para o marcador FDA o período máximo de incubação foi de 10min no escuro e para os demais marcadores a incubação foi de 30min (LELONG; HEGARET; SOUDANT, 2011).

#### 6.2.4 ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statgraphics centurion 17.1.03. A normalidade dos dados foi testada e as variações dos parâmetros analisados foram confirmadas com o teste de homocedasticidade (Teste Levene). Os parâmetros (lipídios, concentração celular, FL3 (clorofila), atividade esterase, concentração de bactérias e percentual de células vivas) foram comparados pelo teste two-way ANOVA (post-hoc LSD Fisher) para verificar a diferença entre o tempo (final da fase lag, fase log e estacionária) e as condições de cultivo (em meio Conway e em água de drenagem agrícola). Um segundo teste estatístico foi realizado (one-way ANOVA) para verificar as diferenças entre os tratamentos em cada tempo para os parâmetros atividade esterase, FL3 e concentração celular. Para todas as análises foi

considerado  $p < 0,05$  como nível de significância. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão.

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA

A água de drenagem agrícola estudada nesta pesquisa apresentou pH 7,2 e concentração de nitrato e fosfato de  $18,21 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1,62 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 6.2). Este achado indica um elevado arrasto de P para os rios que drenam a área estudada, favorecendo assim a eutrofização. A carga de P controla a atividade biológica em ambientes dulcícolas, sendo este elemento o principal fator limitante ao crescimento do fitoplâncton nesses ambientes. Tezuka (1994) considera que a maior parte do P presente na água de drenagem agrícola ocorre na forma de partículas, de maneira que uma grande quantidade desse elemento é presente em águas turvas agrícolas, como a que foi usada nesta pesquisa

Tabela 6. 2. Valor de pH e concentração de Fosfato e Nitrato em água de drenagem agrícola bruta.

Parâmetros	Valores
pH	7,2
Fosfato	$18,21 \text{ mg L}^{-1}$
Nitrato	$1,62 \text{ mg L}^{-1}$

Noriega e Araújo (2009), demonstraram que nas bacias hidrográficas da região Nordeste as cargas drenadas de N chegam  $39.130 \text{ t.ano}^{-1}$  e as de P chegam a  $8.914 \text{ t.ano}^{-1}$ , com máximos valores encontrados nas bacias dos rios Capibaribe e Goiana no Estado de Pernambuco, sendo os esgotos domésticos a principal fonte de nutrientes para as áreas costeiras, com valores que chegam a 51% de N e 45% de P entre todas as fontes antropogênicas e naturais combinadas. As plantações de cana de açúcar representam a segunda maior fonte de emissão, com  $11.762$  e  $3.440 \text{ tano}^{-1}$  de N e P, respectivamente, sendo que as entradas antropogênicas correspondem aproximadamente a 96% das emissões totais. Esses dados podem apresentar variações em função das diferentes entradas de N e P nos ambientes aquáticos, visto que, nesta pesquisa, as concentrações de fosfato foram substancialmente maiores do que as concentrações de nitrato.

Os resultados também se contrapõem com dados de outras regiões, como no Lago Biwa, Japão, onde foi demonstrado que quantidades diárias de N e P fornecida ao lago são da ordem de 19,5 e 1,11 t/dia, respectivamente, segundo o Governo da Província de Shiga, sendo que as fontes desses elementos são as plantações de arroz existentes na região, consideradas as principais causas da eutrofização desse lago (KUNIMATSU; SUDO, 1997; OHKUBO; AZUMA, 2005).

Ressalta-se, entretanto, que as quantidades exatas de nutrientes carregadas para os mananciais a partir das atividades agrícolas são quase impossíveis de serem avaliadas devido à complexa rede de interações que ocorre no solo seja decorrente de processos químicos, retenções biológicas ou infiltrações em camadas subsuperficiais do solo relacionadas à permeabilidade (SCHRODER et al., 2004).

Além disso, formas inorgânicas de P não são absorvidas pelas plantas e são geralmente perdidas no escoamento. Nitratos, embora normalmente presentes no escoamento, são tipicamente perdidos por lixiviação, a partir da zona de enraizamento, e em seguida transferidos para a água subterrânea ou descarregadas em uma massa de água de superfície (FENTON; HUALLACHÁIN, 2012).

### 6.3.2 ENSAIOS DE CRESCIMENTO DAS 11 ESPÉCIES DE MICROALGAS EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA

Das 11 espécies cultivadas em água de drenagem agrícola duas delas: *Synechocistis* sp (D139WC) e *Monoraphidium contortum* (D173WC) foram as que apresentaram os melhores desempenhos (Figura 6.1). A primeira mostrou maior crescimento, porém o teor de ácidos graxos desta espécie, embora também seja superior à soja, é menor do que o observado em *Monoraphidium contortum*. Outras espécies (D77WC, D128WC e D136Z) também apresentaram resposta de crescimento na condição testada, mas os valores máximos de fluorescência registrados para elas foram bem inferiores aos observados em *Synechocistis* sp e em *Monoraphidium contortum*.

Esses resultados evidenciam que outras espécies de microalgas potencialmente produtoras de biodiesel também podem ser cultivadas em água de drenagem agrícola demonstrando a necessidade de novos estudos de bioprospecção como este. Os dados evidenciaram, ainda, que as espécies D109Z (*Synechococcus nidulans*) e D137WC (*Pediastrum tetras*) foram completamente inibidas em água de drenagem agrícola, sendo assim inviável o seu cultivo neste tipo de substrato.

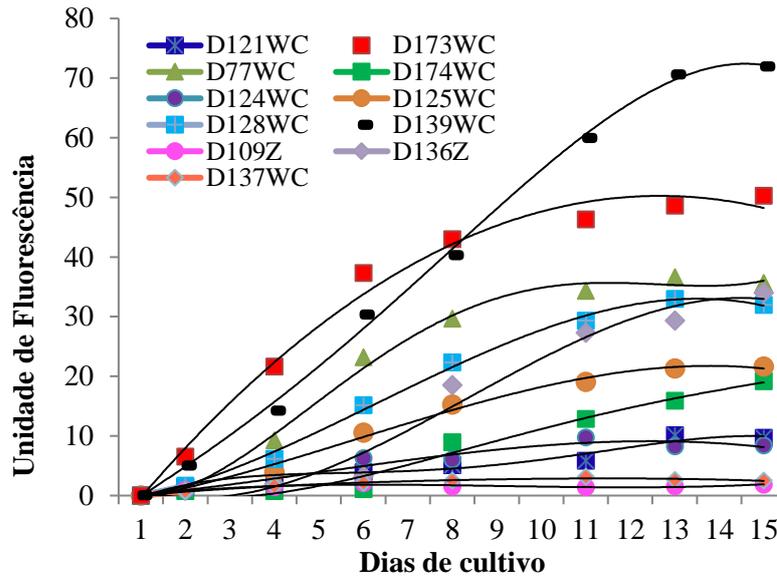


Figura 6.1. Curvas de crescimento de 11 espécies de microalgas testadas em água de drenagem agrícola.

Diversos estudos tem demonstrado crescimento de microalgas em outros tipos de efluentes agroindustriais e da agropecuária, tais como dejetos suínos (BAI et al., 2012; DELABARY, 2012; GAN et al., 2014; ZHU et al., 2013), esterco de galinha (FENTON; HUALLACHAIN, 2016; LIANG; MO; ZHOU, 2013; MARKOU; ICONOMOU; MUYLAERT, 2016; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011), laticínios (LIANG; MULBRY et al., 2008; LEVINE; COSTANZA-ROBINSON; SPATAFORA, 2011; LU et al., 2015; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; WANG et al., 2010), vinhaça (RAMIRES et al., 2014; SANTOS et al., 2016), e manipueira (BORGHETI, 2009), entretanto nenhum trabalho foi encontrado com relação a mitigação de N e P da água de drenagem agrícola usando microalgas. No entanto, nesse tipo de efluente já foram realizados estudos sobre a remoção de pesticidas por microalgas (MATAMOROS; RODRIGUES, 2016), sendo que várias tecnologias de fitorremediação tem sido sugerida para remover esses compostos nesse efluente, incluindo zonas úmidas ou tanques à base de microalgas (VYMAZAL; BREZINOVÁ, 2015), o que resultaria num efluente tratado com alta eficiência (CRAGGS; SUTHERLAND; CAMPBELL, 2012). As mesmas tecnologias poderiam ser aplicadas no caso da remoção de nutrientes visando minimizar efeitos danosos da eutrofização e ao mesmo tempo produzindo biomassa destinada a diversas aplicações biotecnológicas, inclusive produção de biodiesel e biofertilizante.

### 6.3.3 CRESCIMENTO DE *Monoraphidium contortum* EM ÁGUA DE DRENAGEM AGRÍCOLA E CAPACIDADE DE REMOÇÃO DE NUTRIENTES

O cultivo desta espécie em água de drenagem agrícola na concentração de 100% evidenciou maior crescimento no meio controle o qual apresentou um rendimento final muito superior, tanto em número de células como em unidades de fluorescência (Figura 6.2).

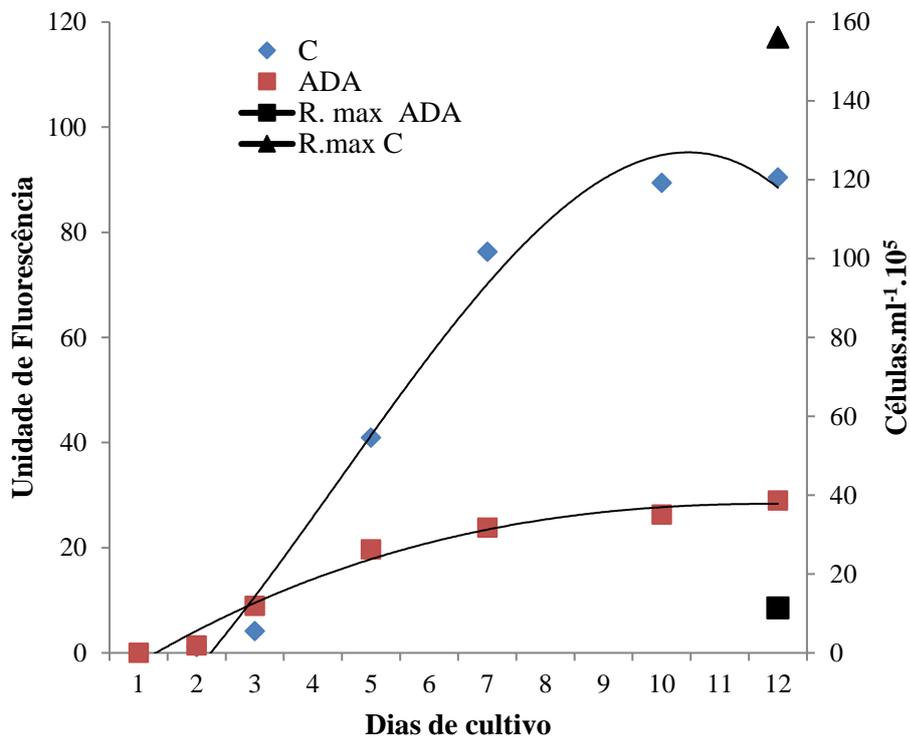


Figura 6.2. Curva de crescimento da microalga *Monoraphidium contortum* em duas condições (meio controle e água de drenagem agrícola) e rendimento máximo da espécie para cada tratamento. C= controle; ADA= água de drenagem agrícola.

O experimento teve a duração de 12 dias e nesse tempo a microalga foi capaz de remover aproximadamente 73% de nitrato após 11 dias de cultivo (TABELA 6.3) e 100% do fosfato no terceiro dia de cultivo (Tabela 6.4) denotando assim uma elevada capacidade de biorremediação do efluente testado por esta espécie de microalga. A escassez de fosfato a partir do 3º dia de cultivo limitou a produtividade de *M. contortum* em água de drenagem agrícola.

Tabela 6.3. Percentual de remoção do nitrato ( $\text{NO}_3$ ) no meio padrão (controle) e na água de drenagem agrícola (ADA) ao longo do cultivo da microalga *Monoraphidium contortum*.

Dias	Controle ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%Remoção	ADA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%Remoção
0	21	0	1,22	0
3	16	23,8	1,14	6,31
5	4,00	80,9	0,89	27,25
7	4,26	79,73	1,08	11,14
9	2,83	86,54	0,86	29,59
11	2,18	89,62	0,33	72,98

Tabela 6.4. Percentual de remoção do fosfato ( $\text{PO}_4$ ) no meio padrão (controle) e na água de drenagem agrícola (ADA) ao longo do cultivo da microalga *Monoraphidium contortum*.

Dias	Controle ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%Remoção	ADA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%Remoção
0	21,00	0	18,21	0
3	12,00	42,86	ND	100
5	10,05	52,13	ND	100
7	7,18	65,82	ND	100
9	7,21	65,65	ND	100
11	7,18	65,82	ND	100

Os dados disponíveis até o momento acerca do crescimento de microalgas em água de drenagem agrícola são muito raros, mas para outros tipos de efluentes a efetividade de remoção de nutrientes por microalgas já foi demonstrada (HERNANDEZ et al., 2016; MATAMOROS et al., 2015; PANDRINI et al., 2016; WANG et al., 2016). Alguns estudos têm sido sugeridos a fim de incrementar a efetividade do processo de biorremediação como o tratamento biológico conjugado, que utiliza o consórcio de microrganismos (bactérias e microalgas) (MUÑOZ; GUIEYSSE, 2006; PANIAGUA-MICHEL; GARCIA, 2003; TOI et al., 2014; VAN DEN HENDE et al., 2014).

Em geral, as necessidades de nutrientes das microalgas são baixas, apesar de que concentrações de fósforo inferiores a  $0,062 \text{ mgP L}^{-1}$ , podem limitar fortemente o crescimento celular (SEI, 2009), assim como as disponibilidades de nitrato devem estar acima de  $0,028 \text{ mg N}^{-1}$  para assegurar crescimento (RASMUSSEN, 2007), apesar de que tais limites sejam específicos para cada espécie (LUDWIG et al., 2008). A remoção de nutrientes, observada neste, estudo sugere que resíduos agrícolas podem ser substitutos adequados de fertilizantes inorgânicos para a produção comercial de microalgas ou inserção da biomassa produzida em

atividades agrícolas, seja como ração, adubo ou biofertilizante (FAO, 2009). Tratando-se de uma espécie potencialmente importante para a produção de biodiesel, como no caso de *Monoraphidium contortum*, a biomassa produzida poderia ainda ser utilizada para a produção de biodiesel ou co-geração de energia. Diversas espécies de *Monoraphidium* armazenam altas quantidades de ácidos graxos em suas células (BOGEN et al., 2013; LANG et al., 2011; MENEZES et al., 2013), sendo assim potencialmente importantes para essa finalidade.

### 6.3.4 METABOLISMO LIPÍDICO E FISIOLOGIA CELULAR

As comparações das respostas fisiológicas relacionadas ao metabolismo lipídico de *Monoraphidium contortum* (Figura 6.3) evidenciaram que houve diferença significativa (ANOVA Two-way) ao longo do tempo (fases do cultivo), para o controle e para a água de drenagem agrícola (F = 26,57; p = 0,0000). Comparando os tratamentos com relação às fases constatou-se que apenas na fase log a diferença foi significativa (F= 71, 66; p = 0,0000). Este achado é relevante, pois pode criar uma expectativa real de que o impacto ambiental das descargas dos efluentes agrícolas pode ser minimizado, e a biomassa de espécies produtoras de lipídios pode ser aplicada para destinações nobres, tais como produção de biodiesel. Imagens da microalga marcada com bodipy podem ser visualizadas na Figura 6.4.

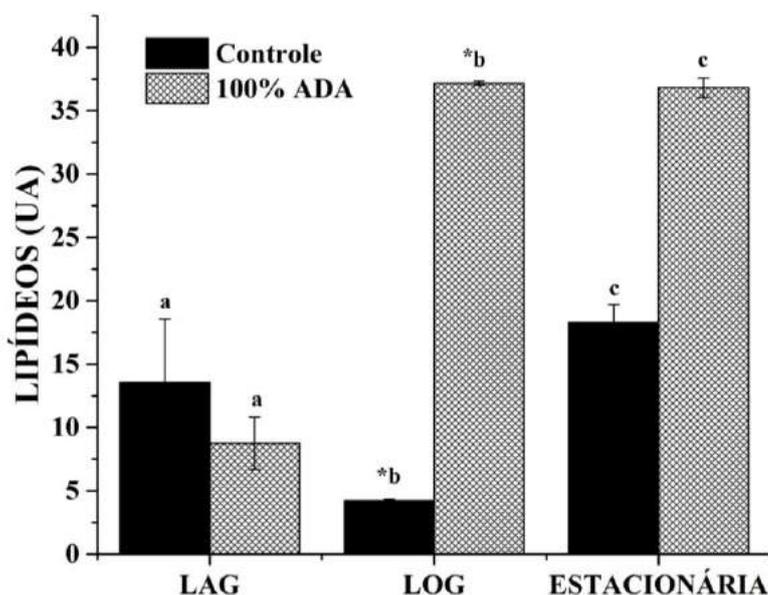


Figura 6.3. Síntese de células lipídicas da microalga *Monoraphidium contortum* marcadas com marcador fluorescente Bodipy nas duas condições, controle (meio WC) e 100%.ADA (água de drenagem agrícola) testadas e nas diferentes fases de cultivo. As letras mostram diferença entre

os tempos em cada condição e o asterisco mostra diferença entre as condições no tempo indicado (UA= Unidade arbitrária).

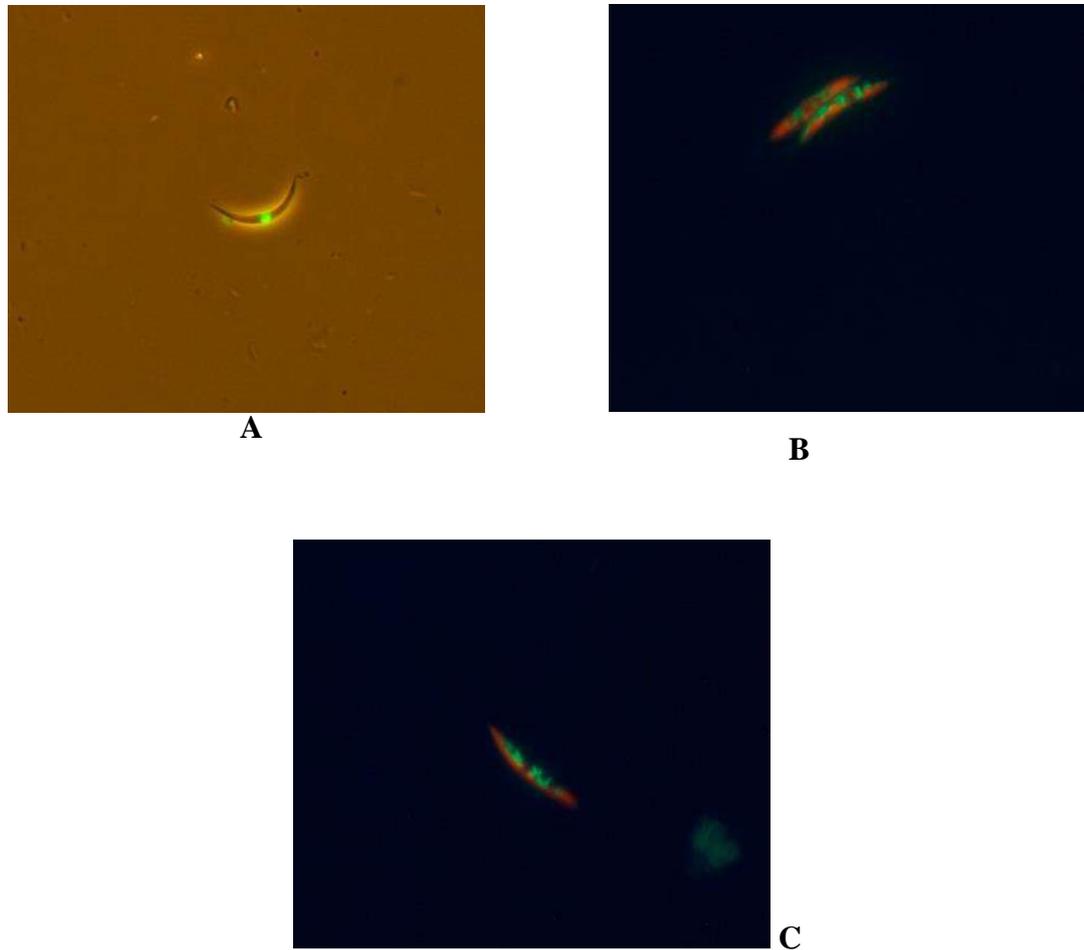


Figura 6.4. Fotografias de *Monoraphidium contortum* marcados com Bodipy para visualização de células lipídicas da microalga no microscópio de fluorescência em contraste de fase (a) e campo escuro (b, c) com aumento de 1000x.

O teste estatístico demonstrou que não há diferença entre os tratamentos com relação à concentração de bactérias marcadas com SybrGreen ( $F = 0,93$ ;  $p = 0,3429$ ), entretanto houve diferença nas fases de cultivo ( $F = 5,66$ ;  $p = 0,0086$ ), sendo a fase lag significativamente diferente das demais fases (Figura 6.5). A presença de bactérias nas duas condições testadas resulta do fato de que os cultivos não eram axênicos. Imagens das bactérias presentes nos cultivos podem ser visualizadas na Figura 6.6.

Park et al. (2008) relatam que culturas de microalgas têm mantido uma relação simbiótica com bactérias, sendo que tal interação incrementa a efetividade na remoção de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em efluentes e promove a redução da demanda biológica de oxigênio (DBO), conforme relatado por Oswald et al. (1953). Ressalta-se, ainda,

que a presença de bactérias usualmente está associada à presença de carbono orgânico dissolvido produzido pelas microalgas (KORMAS et al., 2005; NECHAMA; RUSHANSKY; LEGRAND, 1996) bem como à presença desses elementos na própria água de drenagem agrícola. Diversos autores têm demonstrado a eficácia na biorremediação de efluentes agroindustriais, atribuída a essa relação simbiótica entre microrganismos (DE GODOS et al., 2010; GREEN et al., 2003; GUTZEIT et al., 2005; PEREZ-GARCIA et al., 2010; SUKIAS et al., 2003; TAMER et al., 2006).

Subashchandrabose et al. (2011) sugerem que processos de biodegradação envolvendo o consórcio de cianobactérias/microalgas e bactérias poderão ser sistemas autossustentáveis muito eficazes, mais baratos e tecnicamente superiores, destacando ainda que consórcios de microalgas-bactéria podem produzir metabolitos e subprodutos de grande valor comercial, juntamente com a mitigação do CO<sub>2</sub>.

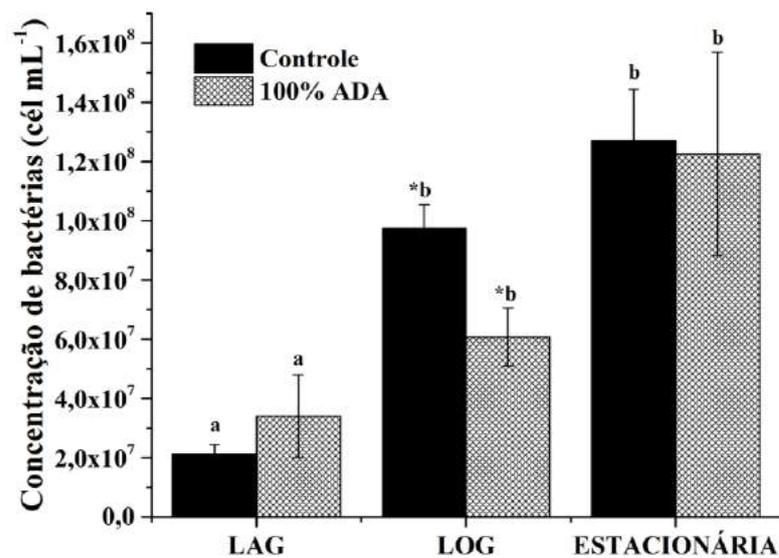


Figura 6.5. Concentração bacteriana nas duas condições de cultivo, controle (meio WC) e 100% ADA (água de drenagem agrícola) da microalga *Monoraphidium contortum*. As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado.

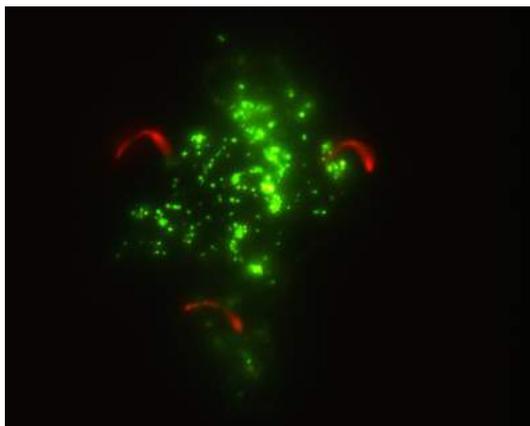


Figura 6.6. Fotografia em microscópio de fluorescência de células bacterianas marcadas com Sybrgreen (em verde) e de células de *Monoraphidium contortum* evidenciadas na coloração vermelha devido a autofluorescência da clorofila, em aumento de 1000x.

Por outro lado, as análises da autofluorescência da clorofila (FL3) evidenciaram valores sempre mais elevados no meio controle (Figura 6.7), muito embora os valores registrados em água de drenagem agrícola foram expressivos, sendo constante nas 3 fases de cultivo. Ho et al. (2014) consideram que as quantidades de nitrogênio interferam diretamente nas taxas fotossintéticas e uma vez que a quantidade de nitrogênio nesse tipo de efluente foi baixa em relação ao cultivo controle, influenciando diretamente na produção do pigmento fotossintético.

O tratamento estatístico para clorofila demonstrou que os valores de FL3 diferem estatisticamente no tempo ( $F = 20,49$ ;  $p = 0,0000$ ) e entre as condições de cultivo ( $F = 109,30$ ;  $p = 0,0000$ ). Comparando os tratamentos com relação ao tempo houve diferença significativa nas três fases: lag ( $F = 35,54$ ;  $p = 0,0000$ ), log ( $F = 207,78$ ;  $p = 0,0000$ ), estacionária ( $F = 50,49$ ;  $p = 0,0000$ ) e apenas o controle na fase lag mostrou diferença significativa dos outros tempos de cultivo (Figura 6.7).

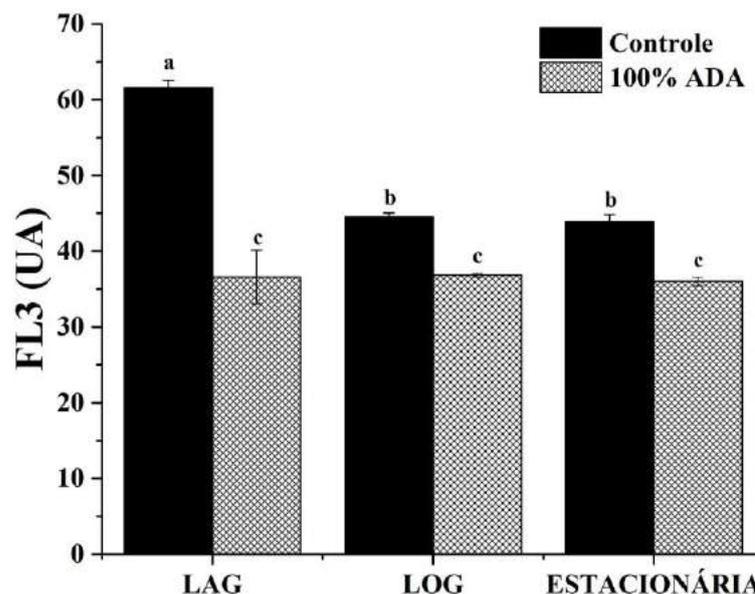


Figura 6.7. Fluorescência da clorofila da *Monoraphidium contortum* nas três fases de cultivo em meio WC (Controle) e em água de drenagem agrícola (ADA). As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado. (UA= Unidade arbitrária).

O tratamento estatístico para a atividade da esterase (FDA, Figura 6.8) evidenciou que houve diferença estatística entre o tempo ( $F = 9,17$ ,  $p = 0,0013$ ) e entre os tratamentos ( $F = 24,55$ ;  $p = 0,0001$ ) sendo que teste de ANOVA One-Way demonstrou diferença entre os tratamentos na fase lag ( $F = 8,41$ ;  $p = 0,0113$ ), log ( $F = 30,50$ ;  $p = 0,0006$ ) e estacionária ( $F = 39,68$ ;  $p = 0,0001$ ), evidenciando esses dados que o efluente estudado não propicia desempenho celular satisfatório, pois foi observada uma diminuição na atividade de esterase durante as fases de cultivo no efluente testado depois de corar as células com diacetato de fluoresceína (FDA). A ação da esterase é a maneira mais comum de medir a resposta fisiológica da enzima celular. As células saudáveis hidrolisam o FDA no interior da célula por esterases, para produzir fluoresceína fluorescente, que é hidrófilo e fica retido no interior de células viáveis por um determinado tempo. A diminuição da fluorescência de fluoresceína indica a atividade da enzima deficiente ou perda de integridade da membrana celular e a redução da ação da enzima esterase é expressa como uma diminuição no número de células que é representada percentualmente (Figura 6.8) (STAUBER; FRANKLIN; ADAMS, 2002). As atividades enzimáticas são uma característica básica de células vitais e assim fornecem informações sobre seu estado fisiológico e algumas dessas atividades como esterase, respiratórias ou fosfatase, podem ser detectadas por citometria de fluxo (HYKA et al., 2013). As atividades de enzimas intracelulares são proporcionais à intensidade da fluorescência do marcador celular e dependem muito da

concentração do marcador, bem como da espécie de microalga estudada, por isso, se faz necessário a padronização do processo.

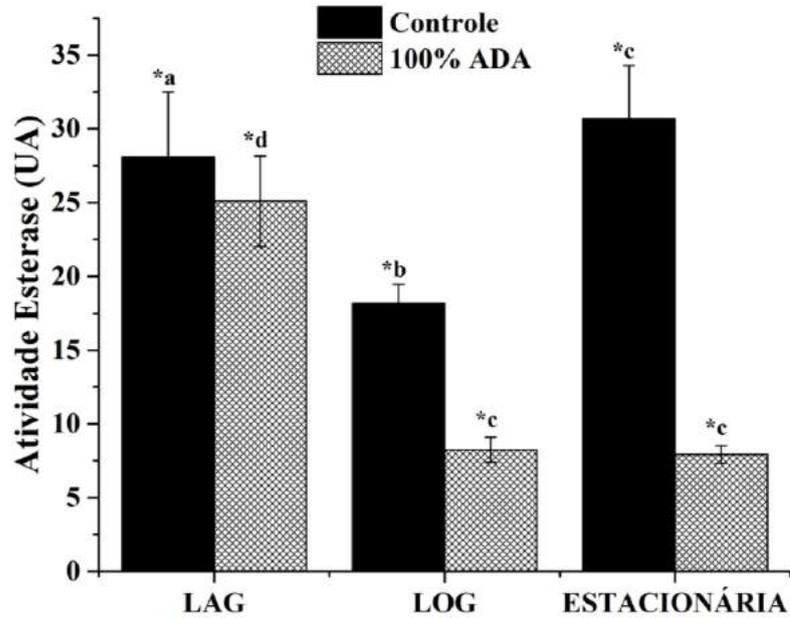


Figura 6.8. Atividade esterase evidenciada na citometria de fluxo através da marcação com FDA em *Monoraphidium contortum* nas três fases de cultivo em meio WC (Controle) e em água de drenagem agrícola. As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado. (UA= Unidade arbitrária).

Hyka et al. (2013) aplicou o FDA como um indicador da vitalidade das células em cultura de *Chlorella vulgaris* sob condições heterotróficas (meio alternativo) contendo mais de 85% de células vitais. Entretanto, no nosso estudo a maior atividade de esterase foi observada no cultivo controle (Figura 6.8), mas com relação ao percentual de células vivas (Figura 6.9), o teste estatístico não demonstrou diferença significativa entre as condições testadas ( $F = 0,43$ ;  $p = 0,5184$ ), muito embora houve diferença significativa entre os tempos de cultivo ( $F = 7,20$ ;  $p = 0,0039$ ).

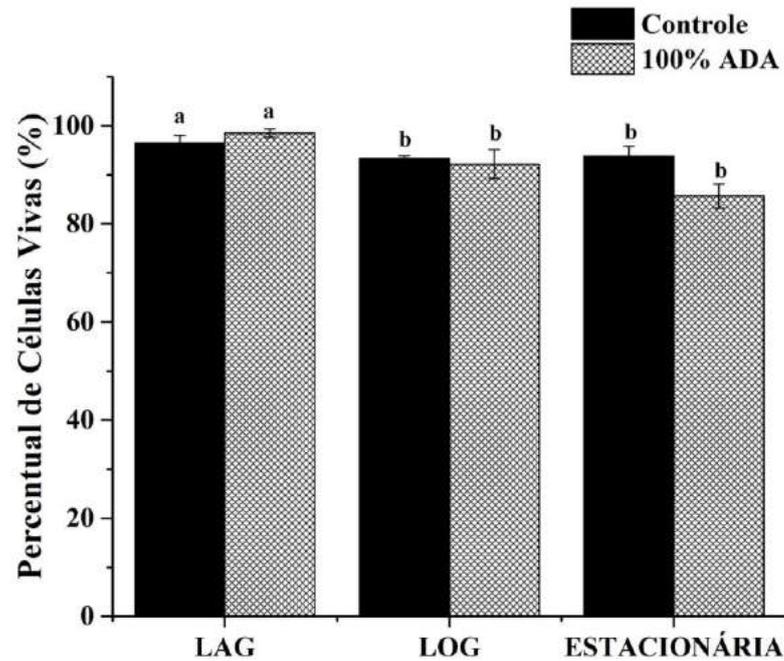


Figura 6.9. Comparação do percentual de células vivas que foram marcadas com FDA na microalga *Monoraphidium contortum* nas duas condições de cultivo testadas, controle (meio WC) e 100% ADA (água de drenagem agrícola). As letras distintas mostram diferença entre os tempos em cada tratamento.

O tratamento estatístico para a densidade celular (Figura 6.10) evidenciou que há diferença estatística entre o tempo e entre os tratamentos ( $F = 4,83$ ,  $p = 0,0152$ ), sendo que o teste ANOVA One-way demonstrou diferença entre os tratamentos na fase lag ( $F = 5,13$ ;  $p = 0,0361$ ), log ( $F = 20,86$ ;  $p = 0,0010$ ) e estacionária ( $F = 23,77$ ;  $p = 0,0006$ ). As análises das duas variáveis acima (tempo e tratamento) evidenciam que uma menor quantidade de células de *Monoraphidium contortum* cultivada no efluente de drenagem agrícola (Figura 6.10) produz comparativamente mais quantidades de lipídeos nas fases log e estacionária do que altas densidades celulares cultivadas no meio controle.

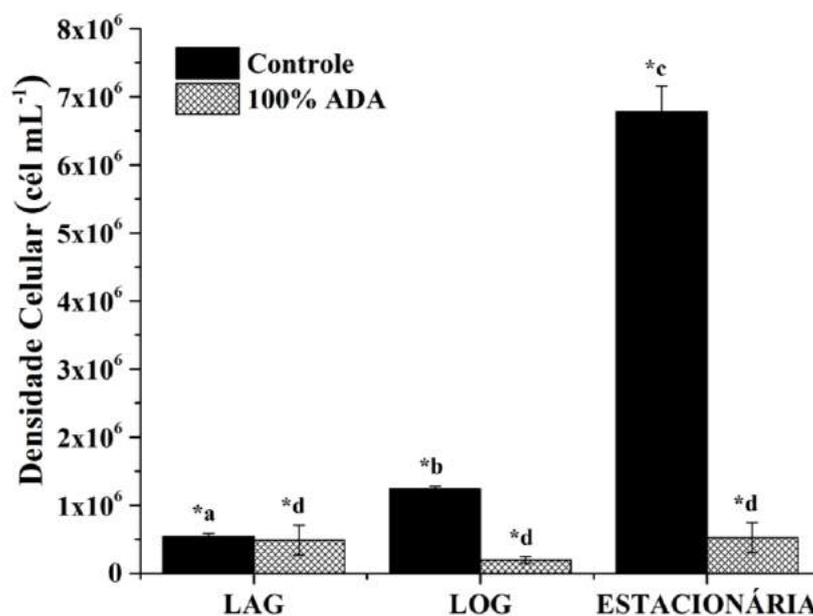


Figura 6.10. Densidade celular determinada por citometria de fluxo de *Monoraphidium contortum* nas três fases de cultivo em meio WC (Controle) e em água de drenagem agrícola (ADA). As letras mostram diferença entre os tempos em cada tratamento e o asterisco mostra diferença entre os tratamentos no tempo indicado.

Nota-se que ao tempo em que *Monoraphidium contortum* reduz as cargas de nitrato e fosfato deste tipo de efluente, sintetiza mais lipídeos que poderiam ser utilizados para a produção de biodiesel, por exemplo, do que as quantidades produzidas em meio sintético. Além disso, a quantidade de nitrato e fosfato no efluente de água de drenagem agrícola é consideravelmente menor em comparação com o meio controle (WC), sendo que a deficiência desses elementos no meio afeta severamente a síntese de proteínas, resultando em um fluxo metabólico no sentido de biossíntese lipídica podendo haver com isso maior acumulação de lipídios nas células de microalgas (COURCHESNE et al., 2009). tornando-se um método vantajoso para a utilização de microalgas cultivadas em resíduos industriais para a produção de biodiesel.

## 6.4 CONCLUSÕES

A água de drenagem agrícola apresenta assim grande potencial de perigo, podendo promover eutrofização em corpos hídricos. O cultivo de microalgas em águas residuais tem sido muito estudado, porém poucos trabalhos relatam o uso de microalgas na bioremediação de água de drenagem agrícola. Nosso estudo demonstrou que *Monoraphidium contortum* é eficaz na remoção de Nitrato e Fosfato do meio, removendo cerca de 72% e 100%, respectivamente. Também demonstrou que quando cultivada em água de drenagem agrícola, esta microalga apresenta potencial acúmulo de lipídeos, sendo possível aplicar comercialmente este tipo de tratamento, gerando biomassa rica em lipídeos que pode ser utilizada para outras finalidades, inclusive produção de energia. Com relação a clorofila, atividade da esterase e densidade celular, o cultivo controle obteve um melhor desempenho, porém a respeito da porcentagem de células vivas e a concentração de bactérias os valores foram similares para ambos os tratamentos.

## REFERÊNCIAS

- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, **Water Environmental Federation**, 20th ed. Washington, 1998.
- BAI, A.; STÜNDL, L.; BÁRSONY, P.; FEHÉR, M.; JOBBÁGY, P.; HERPERGEL, Z.; VASZKÓ, G. **Agronomy for Sustainable Development**, v.32, n. 611-618, 2012.
- BOGEN, C.; KLASSEN, V.; WICHMANN, J.; RUSSA, M. L.; DOEBBE, A.; GRUNDMANN, M.; URONEN, P.; KRUSE, O.; MUSSGNUG, J. H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 622-626, 2013.
- BONFILS, C.L.; LOBELL, D., 2007. Empirical evidence for a recent slowdown in irrigation induced cooling. **PNAS**, v. 104 , n. 34, p 13582–13587, 2007.
- BORGHETT, I. A. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.
- CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORRELL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological Applications**, v.8, v. 559–568, 1998.
- CORRELL, D. L. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. **Journal Environmental Quality**, v.27, p. 261–266, 1998.
- COSTA J.R.; O.S.; NIMMO, M.; ATTRILL, M.J. Coastal nutrification in Brazil: A review of the role of nutrient excess on coral reef demise. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 25, p. 257–270, 2008.
- COURCHESNE, N. M. D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN, C. Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31-41, 2009.
- CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of highrate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production, **Journal Applied Phycology**, v. 24, p.329–337, 2012.
- DE GODOS, I.; VARGAS, V. A.; BLANCO, S.; GONZÁLEZ, M.C.G.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A, et al. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggyery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource Technology** v.101, p.5150–8, 2010.
- DERNER, R. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. **Tese de doutoramento**, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 140p, 2006.

DÖLL, P.; SIEBERT, S. A Digital Global Map of Irrigated Areas. Kassel, Germany: University of Kassel - Centre for Environmental Systems Research. , Germany, University of Kassel. 43p, 1999.

DUDGEON, D. Large-scale hydrological changes in tropical Asia: prospects for riverine biodiversity. *BioScience*, v. 50, n. 9, p. 793–806, 2000.

FAO, Review of the State of World Aquaculture. Fisheries Circular No. 886, Rev 2. Fishery Resource Division. Rome, 2003.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2013. World Food and Agriculture. Rome. FAO, 2013.

FAO. The state of food and agriculture, Rome, FAO, 2009.

FAO. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London, 2011.

FENTON, O.; HUALLACHÁIN, D. O. Agricultural nutrient surpluses as a potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. **Algal Research**, v. 1, p. 49-56, 2012.

GAN, K.; MOU, X.; XU, Y.; WANG, H. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v.171, p. 285-290, 2014.

GREEN, F. B.; LUNDQUIST, T.J.; QUINN, N.W.T.; ZARATE, M.A.; ZUBIETA, I.X.; OSWALD, W.J. Selenium and nitrate removal from agricultural drainage using the AIWPS® technology. **Water Science Technology** , v.48, p.299–305, 2003.

GUILLARD R. R. L.; LORENZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **J. Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUTZEIT, G.; LORCH, D.; WEBER, A.; ENGELS, M.; NEIS, U. Biofloculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science Technology*, v. 52, p.9–18, 2005.

HARMEL, R.D.; S. QIAN, K.; RECKHOW, P.; CASEBOLT. The MANAGE database: Nutrient load and site characteristic updates and runoff concentration data. *Journal Environmental Quality*, n. 37, p. 2403-2406, 2008.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B. .; COCA, M.; SOLANA, M.; BERTUCCO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 285, p. 449-458, 2016.

HO, S.H.; CHAN, M.C.; LIU, C.C.; CHEN, C.Y.; LEE, W.L.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 275–282, 2014.

HOWARTH, R. W. An assessment of human influences on fluxes of nitrogen from the terrestrial landscape to the estuaries and continental shelves of the North Atlantic Ocean. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 52, p. 213–223, 1998.

HUSSAIN I.; HANJRA, M.A. Does irrigation matter for poverty alleviation: review of the empirical evidence. Unpublished report, International Water Management Institute, Colombo, Sri Lanka, 2003.

HUSSAIN, I.; HANJRA, M.A. Irrigation and poverty alleviation: review of the empirical evidence. **Irrigation and Drainage**, v. 53, n. (1), p. 1–15, 2004.

HYKA, P.; LICKOVA, S.; PRIBYL, P.; MELZUCH, K.; KOVAR, K. Flow cytometer for development of biotechnological process with microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 2-16, 2013.

ISIDORO, D.; QUILEZ, D.; ARAGUES, R. Environmental impact of irrigation in La Violada District (Spain): II nitrogen fertilization and nitrate export patterns in drainage water. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, p. 776-785, 2006.

KHAN, S.; HANJRA, M.A. Footprints of water and energy inputs in food production – Global perspectives. **Food Policy**, n. 34, p. 130–140, 2009.

KORMAS, K. A. Bacterioplankton growth on extracellular organic carbon from marine microalgal cultures. **Cahiers Biologie Marine**, v. 46, n. 3, p. 241-251, 2005.

KOTAK, B.G.; S.L. KENEFICK; D.L FRITZ.; ROUSSEAUX, C. G.; PREPAS, E. E.; HRUDEY, S. E. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. **Water Research**, v. 27, p. 495–506, 1993.

KUNIMATSU, T.; SUDO, M. Characteristics of stream water quality stream and runoff of pollution load from forest. *Lake Biwa Res Inst*, v.14, p.6–15, 1997.

LANG, I.; HODAC, L.; FRIEDL, T.; FEUSSNER, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1 p. 124, 2011.

LELONG, A.; HEGARET, H.; SOUDANT, P. Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-Nitzschia multiseries*, a toxic diatom. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 969-981, 2011.

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.1, p. 40-49, 2011.

LIANG, G.; MO, Y.; ZHOU, Q. OPTIMIZATION OF DIGESTED CHICKEN MANURE FILTRATE supplementation for lipid overproduction in heterotrophic culture *Chlorella protothecoides*. **Fuel**, v.108, p. 159-165, 2013.

LIU, S.; ZHU, Z.; FAN, C.; QIU, Y.; Zhao, J. Seasonal variation effects on the formation of trihalomethane during chlorination of water from Yangtze River and associated cancer risk assessment. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n.9, p.1503-1511, 2011.

LOLADZE, I.; ELSER, J. J. The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. **Ecology Letters**, v. 14, n. 3, p. 244-250, 2011.

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

LU, W.; WANG, Z.; WANG, X.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, v.192, p. 382-388, 2015.

LUDWIG, A.; MATLOCK, M.; HAGGARD, B.E.; MATLOCK, M.; CUMMINGS, E. Identification and evaluation of nutrient limitation on periphyton growth in headwater streams in the Pawnee Nation, Oklahoma, **Ecological Engineering**, v. 32, p. 178–186, 2008.

MARKOU, G; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green-algae) in agro-industrial waste and wastewaters: A review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.

MARKOU,G., ICONOMOU D., MUYLAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v.13, p. 79-84, 2016.

MATAMOROS, V.; GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. CAPABILITY OF microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, v.288, p. 34-42, 2015.

MATAMOROS, V.; RODRIGUEZ, Y. Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: A laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 309, p. 126-132, 2016.

MATAMOROS, V.; Y, RODRIGUEZ. Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: A laboratory scale study, *Journal of Hazardous Materials*, v. 309, p. 126-132, 2016.

MEA. General Synthesis Report: Ecosystems and Human Well-being. MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Island Press, Washington, 2005.

MENEZES, R.S; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONOISI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 13, n.1, p. 10-15, 2013.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers, **Bioresource Technology**, v. 99, p8137–8142, 2008.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, p. 2799–2815, 2006.

NARAYANAMOORTHY, A.; HANJRA, M. Rural infrastructure and agricultural output linkages: a study of 256 Indian districts. **Indian Journal of Agricultural Economics**, v. 61, n.3, p. 444–459, 2006.

NECHAMA Z.; RUSHANSKY, M.; LEGRAND, C. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. **Marine Ecology Progress Series**, v.132, p. 249-255, 1996.

NORIEGA, C; ARAÚJO, M. Nitrogen and phosphorus loading in coastal watersheds in northeastern Brazil. **Journal of Coastal Research. Special**, n. 56, p. 871 – 875, 2009.

OENEMA, O.; WRAGE ,N.; VELTHOF, G.L.; VAN GROENIGEN ,J.W.; DOLFING, J.; KUIKMAN, P.J. Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.72, p51-65, 2005.

OHKUBO, T.; AZUMA, Y. 2005. Load of turbid from the watershed of Lake Biwa and its effect on the lake water quality. Memorial Volume of the Lake Biwa Research Institute, p. 55–72, 2005.

OSWALD, W.; GOTAAS, H.; LUDWIG, H.; LYNCH, V. Algae symbiosis in oxidation ponds: III. Photosynthetic oxygenation. **Sewage Indust Wastes**, v 25, p. 692–705, 1953.

PANIAGUA-MICHEL, J.; GARCIA, O. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluente using constructed microbial mats. **Acquaculture Engineering**, v. 28, n. 3-4, p. 131-139, 2003.

PARK, Y.; JE, K-W.; LEE, K.; JUNG. S-E.; CHOI, T-J. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by coinoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. **Hydrobiologia**, v. 598, p. 219–28, 2008.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J-P.; BASHAN, Y. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Phycology**, v.46, p.800–12, 2010.

PINDICH, R., RUBENFELD, D. **Econometric models and economic forecasts**. 2 ed. New York: **Mc Graw-Hill**, 492 p, 1981.

PRANDINI, J.M.; SILVA, M. L. B.; MEZZARI, M. P.; PIROLI, M.; MICHELON, W.; SOARES, H. M. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67-75, 2016.

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

RANDALL, G.W.; DELGADO, J.A.; SCHEPERS, J.S. Nitrogen Management to Protect Water Resources. In Nitrogen in Agricultural Systems, eds. J.S. Schepers and W.R. Raun, 911-945. Agronomy Monograph 9. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2008.

RASMUSSEN, M. Primary biomass production from marine algae. University of Aarhus: **National Environmental Research Institute**; Memorandum for VE-net, 2007.

REDFIELD, A. C. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In Daniel, R.J. [Ed.] James Johnstone Memorial

Volume. University Press of Liverpool, pp. 177–92, 1934.

ROCKSTROM, J.; LANNERSTAD, M.; FALKENMARK, M. Assessing the water challenge of a new green revolution in developing countries. *PNAS*, v. 104, n. 15, p. 6253–6260, 2007.

SANTOS, R.R.; ARAÚJO, O. Q. F.; MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v.204, p.38-48, 2016.

SCHRÖDER, J.J.; D. SCHOLEFIELD, F. CABRAL.; G. HOFMANS. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. *Environmental Science and Policy*, v. 7, n. 1, p. 15-23, 2004.

SEI, A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland, 2009.

SHARPLEY, A.N.; DANIEL T.; GIBSON, G.; BUNDY, L.; CABRERA, M.; SIMS, T.; STEVENS, R.; LEMUNYON, J.; KLEINMAN, P.; PARRY, R. Best Management Practices To Minimize Agricultural Phosphorus Impacts on Water Quality. U.S. Department of Agriculture, **Agricultural Research Service**, ARS–163, 50 pp, 2006.

SHELDRIK, W. F.; SYERS, J. K.; LINGARD, J. A conceptual model for conducting nutrient audits at national, regional, and global scales, **Nutrition Cycle Agroecosystem**, v. 62, p. 61–72, 2002.

SILVA, L.F. Solos tropicais: Aspectos pedológicos, ecológicos e de manejo. São Paulo: **Terra Brasilis Editora**, 137p, 1996.

STAUBER, J. L.; FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S. Application of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. **Trends in Biotechnology-Cell Press**, v. 20, n. 4, p. 141-143, 2002.

SUBASHCHANDRABOSE, S.R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 896–907, 2011.

SUKIAS, J.P.S.; CRAGGS, R.J.; TANNER, C.C.; DAVIES-COLLEY, R.J.; NAGELS, J.W. Combined photosynthesis and mechanical aeration for nitrification in dairy waste stabilisation ponds. *Water Science Technology*, v. 48, p. 137–44, 2003.

TAMER, E.; AMIN, M.A.; OSSAMA, E.T.; BO, M.; BENOIT, G. Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water Science Technology*, v. 53, p.117–25, 2006.

TILLNER, J.; HOLLARD, C.; BACH, C.; ROSIN, C.; MUNOZ, J.; DAUCHY, X. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their chlorination by-products in drinking water and the coatings of water pipes by automated solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1315, p. 36-46, 2013.

TILMAN D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D’ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, p.281–

284.2001.

TOI, H. T.; BOECHX, P.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V. Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to mono-diets, as demonstrated by a  $^{15}\text{N}$  isotope uptake laboratory study, *Aquaculture*, v. 422-423, p. 109-114, 2014.

TURRAL, H.; BURKE, J. Sustainable crop production and intensification in irrigated cropping systems. Land and Water Division, FAO, Rome, 2010.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; BOREEN, G.; BOON, N.; VERVAEREN, H. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 342-354, 2014.

VYMAZAL, J.; BREZINOVÁ, T. The use of constructed wetlands for removal of pesticides from agricultural runoff and drainage: a review, **Environment International**, v. 75, p. 11–20, 2015.

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. 8, p.2623–2628, 2010.

WANG, L.; LIU, J.; ZHAO, Q.; WEI, W.; SUN, Y. Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems **Bioresource Technology**, v.211, p.1-5, 2016.

YU, X.; ZHAO, P.; HE, C.; LI, J.; TANG, X.; ZHOU, J.; HUANG, Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. **Bioresource Biotechnology**, v. 121, p. 256-262, 2012.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *spirulina máxima*. 1966. **Thesis (Ph.D)** - Université Des Paris, Paris, 1966.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment **Water Research**, v. 47, p. 4294–4302, 2013.

## 7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Atualmente, muito se tem discutido sobre questões ambientais relacionadas aos impactos produzidos pelas diversas atividades antrópicas, principalmente aqueles oriundos da produção industrial. Inúmeros sistemas produtivos têm provocado degradação de recursos naturais e os efeitos desses processos estão ficando cada vez mais evidentes, tornando-se premente a necessidade de minimizar tais ações. As energias renováveis surgem como uma das medidas a serem adotadas, principalmente por serem oriundas de fontes sustentáveis, e por representarem uma importante base para o desenvolvimento social e económico. Por outro lado, o cenário das energias renováveis ainda apresenta um custo elevado, sendo este um dos principais gargalos para o uso dessas energias. O desenvolvimento de projetos de energias renováveis deverá ainda continuar por muito tempo, uma vez que muitas empresas e autoridades públicas estão cada vez mais envolvidas nesse interesse.

Uma das alternativas energéticas que vem sendo bastante pesquisada, comentada e incentivada por órgãos públicos, são os biocombustíveis, muitas vezes originados de plantas como a cana-de-açúcar, beterraba e milho para a produção do álcool, e oleaginosas, tais como soja, mamona, pinhão, palma e atualmente microrganismos fotossintetizantes como as microalgas. Em comparação com combustíveis fósseis, os biocombustíveis têm inúmeras vantagens, tais como renovação mais rápida e redução de emissões de gases de efeito de estufa, minimizando assim a degradação ambiental provocada por aqueles.

As principais preocupações relacionadas à utilização dos biocombustíveis derivados de plantas oleaginosas incluíram a segurança alimentar, escassez de terra para cultivo e necessidade de irrigação. Uma alternativa é utilização de microalgas para a produção de biocombustíveis. As microalgas são capazes de gerar bioenergia utilizando áreas muito menores para cultivo do que as utilizadas na agricultura tradicional. Entretanto, a produção de biodiesel a partir de microalgas ainda apresenta custos elevados devido a problemas operacionais e técnicos, que vão desde as práticas de cultivo até a extração e produção de biocombustível. Devido ao custo de produção elevado, o biocombustível de microalgas não é capaz de competir diretamente com os combustíveis à base de petróleo até o momento, razão pela qual se busca aprimorar metodologias que visam à redução dos custos. Uma das opções consiste em utilizar águas residuais oriundas das atividades antrópicas como meio alternativo de cultivo para a produção de biomassa microalgal em larga escala, visto que muitas espécies de microalgas são eficientes biorremediadores desses efluentes.

Neste estudo foram testados três tipos de resíduos de atividades agroindustriais como substrato para o cultivo de microalgas potencialmente importantes à produção de biodiesel: água de lavagem de biodiesel, efluente de carcinicultura e água de drenagem agrícola. Foram testadas 11 espécies regionais de microalgas dulcícolas: *Pediastrum tetras*, *Monoraphidium contortum*, *Cosmarium* sp., *Lagerheimia longiseta*, *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus quadricauda*, *Synechococcus nidulans*, *Pediastrum tetras*, *Synechocystis* sp., *Chlorococcum* sp., e uma clorofícea não identificada e uma espécie marinha: *Amphora* sp. Tais espécies pertencem ao banco de cultivo de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) onde são mantidas em meios sintéticos, e foram selecionadas pelo fato de produzirem substanciais quantidades de ácidos graxos, com algumas espécies inclusive muito superiores à soja.

Das 11 espécies testadas em água de lavagem de biodiesel apenas duas apresentaram bom crescimento. Destas, optou-se por avaliar a efetividade de biorremediação deste efluente a espécie *Monoraphidium contortum*, pelo fato dela apresentar maior capacidade de crescimento e por ser a segunda espécie com maior teor de ácidos graxos dentre as testadas. O experimento demonstrou que esta espécie tem grande capacidade de reduzir as concentrações de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ , e a DQO em percentuais que chegam a 25,8%, 7,2% e 31,2%, respectivamente.

A espécie marinha *Amphora* sp. testada em água de carcinicultura apresentou excelente crescimento neste efluente com grande capacidade de síntese de lipídios, embora o rendimento máximo em biomassa e quantidade de células tenha sido inferior ao controle. Sua capacidade de remover  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{NO}_2$  nesse efluente foi de 73,357%, 72,572% e 66,667, respectivamente.

Das 11 espécies testadas em água de drenagem agrícola duas delas: *Synechocystis* sp e *Monoraphidium contortum* foram as que apresentaram os melhores desempenhos. A primeira apresentou maior crescimento, porém o teor de ácidos graxos desta espécie, embora superior à soja, é menor do que o observado em *Monoraphidium contortum* razão pela qual esta espécie foi selecionada para testar sua capacidade de biorremediação desse efluente. Nessa condição, a produção de biomassa e o rendimento final em número de células foram inferiores ao controle, mas mesmo assim *Monoraphidium contortum* removeu aproximadamente 73% de  $\text{NO}_3$  e 100% de  $\text{PO}_4$  após 11 dias de cultivo. As respostas fisiológicas por citometria de fluxo evidenciaram maior produção de lipídeos no efluente, porém as concentrações celulares, fluorescência da clorofila e atividade da esterase foram mais elevadas no controle.

Pode-se concluir, partir do estudo, que as microalgas selecionadas, de fato, podem atuar como eficientes biorremediadores dos efluentes testados, e, ao mesmo tempo, podem produzir quantidades de biomassa e/ou lipídios em quantidades expressivas. Desse modo, a pesquisa

abre novos horizontes de investigação visto que um duplo interesse pode ser identificado com os resultados obtidos, como a redução das concentrações de nutrientes presentes nesses efluentes para níveis mais apropriados ao seu descarte, minimizando assim impactos ambientais, e a produção de biomassa microalgal que pode ser usada para produção de biodiesel ou outros coprodutos de interesse à biotecnologia, reduzindo assim os custos de produção em cultivos em massa.

Ao mesmo tempo a pesquisa também aponta para a necessidade de novos estudos sobre as respostas fisiológicas decorrentes de alterações nas formulações dos meios alternativos utilizados e das condições de cultivo, como formas de incrementar a síntese de produtos de interesse como os lipídeos e incremento na produção de biomassa em sistemas de cultivo em larga escala.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ABCC. Código de Conduta e de Boas Práticas de Manejo para uma Carcinicultura Ambientalmente Sustentável e Socialmente Responsável. 2 ed., 18p., ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão, Recife, PE, Brasil, 2004.
- AHMED, F.; FANNING, K.; NETZEL, M.; TURNER, W.; LI, Y.; SCHENK, P. M. Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish water. **Food Chemistry**, v. 165, p. 300-306, 2014.
- AIDAR-ARAGÃO, E. Alguns aspectos da autoecologia de *Skeletonema costatum* (Gréville) Cleve, de Cananéia (25°S - 48°W), com especial referência ao fator salinidade. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 2v, 1980.
- AIDAR-ARAGÃO, E.; TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Produção primária e concentração de clorofila-a na costa brasileira (Lat. 22° 31'S - Long. 41°52'W a Lat. 28°43'S - Long. 47°57'W). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 29, n.2, p. 9-14, 1980.
- ALVARES, P. J.J. & WILMAN, W.A.. Biorremediation and Natural Attenuation. Process Fundamentals and Mathematical Models. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey., 209p., 2006.
- ANEEL, 2015. <http://www.aneel.gov.br/>, acessado em janeiro de 2015.
- ANH, P.T.; KROEZE, C.; BUSH, S.R.; MOL, A.P.J. Water pollution intensive brackish shrimp in south-east Vietnam: Causes and options for control. **Agricultural Water Management**, v. 9, n. 6, p. 872-882, 2010.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, 2015. <http://www.anp.gov.br/?id=470> (Accessed 29 September 2015).
- ANTIA, N. J.; BERLAND, B. R.; BONIN, D. J.; MAESTRINI, S. Y. Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. **Phycology**, v. 16, n. 1, p. 105-111, 1977.
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American public health Association. American Water Works Association, **Water Environmental Federation**, 20th ed. Washington, 1998.
- ATADASHI, I.M., AROUA, M.K., ABDUL AZIZ, A.R., SULAIMAN, N.M.N.; J. High quality biodiesel obtained through membrane technology. **Journal of Membrane Science**, v. 421-422, p. 154-164, 2012.
- BAI, A.; STÜNDL, L.; BÁRSONY, P.; FEHÉR, M.; JOBBÁGY, P.; HERPERGEL, Z.; VASZKÓ, G. Algae production on pig sludge. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 3, p. 611-618, 2012.
- BARCELLOS, F.C.; OLIVEIRA, J.C.; CARVALHO, P.G.M. Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia. **Revista Iberoamericana de Economía Ecológica**, v. 12, p. 33-50, 2009.

BELEZA, V. M. Actas da Conferência Internacional Sobre Água: International Water Conference, Porto, 2006: **Centro de Estudos de Água**, p. 582-585, 2006.

BEM-AMOTZ, A.; FISHLER, R.; SCHNELLER, A. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. **Marine Biology**, v. 95, p. 31-36, 1987.

BLINN, D. W. Growth responses to variations in temperature and specific conductance by *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v. 19, p. 31-35, 1984.

BOGEN, C.; KLASSEN, V.; WICHMANN, J.; RUSSA, M. L.; DOEBBE, A.; GRUNDMANN, M.; URONEN, P.; KRUSE, O.; MUSSGNUM, J. H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 622-626, 2013.

BONFILS, C.L.; LOBELL, D., 2007. Empirical evidence for a recent slowdown in irrigation induced cooling. **PNAS**, v. 104, n. 34, p. 13582-13587, 2007.

BORGHETT, I. A. **Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de manipueira**. Dissertação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

BRAND, L. E. The salinity tolerance of forty-six marine phytoplankton isolates. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 18, n. 5, p. 543-556, 1984.

BRASIL. Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Relatório final**. Brasília, DF, 105p, 2005.

BRASIL. Resolução CONAMA n. 312 de 10 de outubro de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de áreas de preservação permanente. **Diário Oficial da União**, n.224, s.1, p.92-95, 2002.

BRITO, J.F.; FERREIRA, L.O.; SILVA, J. P.; RAMALHO, T. C. Tratamento da água de purificação do biodiesel utilizando eletrofloculação. **Química Nova**, v.35, n. 4, p. 728-732, 2012.

BROWN, L.M.; ZEILER, K.G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion Management**, v. 34, p. 1005-1013, 1993.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 145, p. 79-99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151, p. 315-331, 1997.

BURFORD, M. A.; THOMPSON, P. J.; McINTOSH, R. P.; BAUMAN, R. H.; PEARSON, D. C. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v. 219, p. 393-411, 2003.

BURLEW, J.S. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, p. 357, 1953.

CAERS, M; COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L). **Aquaculture**, v.170, p. 307-322, 1999.

CALIXTO, C.D.; SASSI, C.F.C.; SASSI, R.; CONCEIÇÃO, M.M. Bioprospecção de microalgas isoladas do Nordeste brasileiro quanto à potencialidade para a produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2016. (Artigo para submissão).

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORRELL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological Applications**, v.8, p. 559–568, 1998.

CASTRO, A. R. C. Utilização de adubo orgânico em cultura de fitoplâncton. Rio de Janeiro, **PESAGRO**, 2p, 1979.

CASTRO, A.A.; PAGANI, G.D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei* Boone) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 123- 129, 2004.

CHAVAN, A; MURKHERJ, S. Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: Effect of N:P ratio. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 63–72, 2008.

CHEN, G.; ZAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v.137, p. 282-291, 2015.

CHEN, Y.; CHENG, J. J.; CREAMER, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. **Bioresource Technology**, 99, p 4044-4064, 2008.

CHI, Z.; PYLE, D.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-derived glycerol by microalgal fermentation. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1537-1545, 2007.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; CLAXTON, R.; DAS, K.C. Biomass and energy production potential of microalgae consortium in open and closed bioreactors using untreated carpet industry effluent as growth medium. **Bioresource Technology**, v.101, n.17, p. 6751-6760, 2010.

CHINNASAMY, S.; BHATNAGAR, A.; HUNT, R. W.; DAS, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. **Bioresource Technology**, v.101, n. 9, p.3097-3105, 2010.

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

CHISTI Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **Journal of Biotechnology**, v.167, p. 201–14, 2013.

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

CHO, S.; LEE, N.; PARK, S.; YU, J.; THANH, T. L.; LUONG, T. T.; LEE, T. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources, **Biosource Technology**, v. 13, p. 515-520, 2013.

CHU, F-F.; CHU, P-N.; SHEN, X-F.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 241-246, 2014.

CHU, W.-L.; LIM, Y.-W; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P.-E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BCM Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 53, p. 3-8, 2010.

CLEVELAND, J. S.; PERRY, M. J. Quantum yield, relative specific absorption and fluorescence in nitrogen-limited *Chaetoceros gracilis*. **Marine Biology**, v. 94, p. 489-497, 1987.

COOK, J.; BEYEA, J. Bioenergy in the United States: Progress and Possibilities. **Biomass and Bioenergy** v. 18, p. 441-455, 2000.

CORRELL, D. L. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. **Journal Environmental Quality**, v.27, p. 261-266, 1998.

COSTA J.R.; O.S.; NIMMO, M.; ATTRILL, M.J. Coastal nutrification in Brazil: A review of the role of nutrient excess on coral reef demise. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 25, p. 257-270, 2008.

COURCHESNE, N. M. D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN, C. Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31-41, 2009.

COURCHESNE, N.M.D.; PARISIEN, A.; WANG, B.; LAN.; C.Q. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **Journal of Biotechnology**, v. 141, p. 31-41, 2009.

CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of highrate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production, **Journal Applied Phycology**, v. 24, p.329-337, 2012.

CRESSWELL, R. C., SYRETT, P. J. Ammonium inhibition of nitrate uptake by the diatoms *Phaeodactylum tricoratum*. **Plant science letters**, v. 14, n. 4, p. 321-325, 1979.

DAUD, M.N.; ABDULLAH, S.R.S.; HASAN, H.A.; YAAKOB, Z. Production of biodiesel and its wastewater treatment Technologies: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, 2014.

DAVIS, R.; ADEN, A.; PIENKOS, P. T. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3524-3531, 2011.

DE GODOS, I.; VARGAS, V. A.; BLANCO, S.; GONZÁLEZ, M.C.G.; SOTO, R.; GARCÍA-ENCINA, P. A, et al. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggyery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource Technology** v.101, p.5150–8, 2010.

DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611-1627, 2010.

DERNER, R. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados.** Tese de doutoramento, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, 140p, 2006.

DIANURSANTI.; RIZKYTATA, B.T.; GUMELAR, M.T.; ABDULLAH, T.H. Industrial tofu wastewater as a cultivation médium of microalgae *Chlorella vulgaris*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 56-61, 2014.

DINIS, M. A.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. Edições Universidade Fernando Pessoa: **Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 41-54. 2004.

DÖLL, P.; SIEBERT, S. A Digital Global Map of Irrigated Areas. Kassel, Germany: University of Kassel - Centre for Environmental Systems Research. , Germany, University of Kassel. 43p, 1999.

DUDGEON, D. Large-scale hydrological changes in tropical Asia: prospects for riverine biodiversity. *BioScience*, v. 50, n. 9, p. 793–806, 2000.

EJF. **Smash & Grab: Conflict, Corruption and Human Rights Abuses in the Shrimp Farming Industry.** **Environmental Justice Foundation**, London, UK. 33p., 2003

EI-KASSAS, H.Y; MOHAMED, L.A, Bioremetion of the textile effluente by *Chlorella vulgaris*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, p. 301-308, 2014.

EMAMJOMEH, M. M., SIVAKUMAR, M. Review of pollutants removed by electrocoagulation and electrocoagulation/flotation processes. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 5, p. 1663-1679, 2009.

EVENS, T. J.; NIEDZ, R. P.; KIRKPATRICK, G. J. Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n 4, p. 411-422, 2008.

FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and ligh nutrient concentrations. **Aquaculture**, v.50, p. 1-11, 1985.

FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; EIGA, M. Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrients concentrations. **Aquaculture**, v.42, p. 207-215, 1984.

FABREGAS, J.; TORIBIO, L.; ABALDE, J.; CABEZAS, B.; HERRERO, C. Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch culture. **Aquacultural Engineering**, v. 6, p.141-150, 1987.

FACHET, M.; HERMSDORF, D.; RIHKO-STRUCKMANN, L.; SUNDMACHER, K. Flow cytometry enables dynamic tracking of algal stress response: A case study using carotenogenesis in *Dunaliella salina*. **Algal Research**, v. 13, p. 227-234, 2016.

FAN, L.; VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). **Journal of Phycology**, v. 30, p. 829–833, 1994.

FAO, Review of the State of World Aquaculture. Fisheries Circular No. 886, Rev 2. Fishery Resource Division. Rome, 2003.

FAO. The state of food and agriculture, Rome, FAO, 2009.

FAO. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London, 2011.

FAO. FAO Statistical Yearbook 2013. World Food and Agriculture. Rome. FAO, 2013.

FARMER, J. Grazing and bioturbation in modern microbial mats. In: Schopf, J.W., Klein, C. (Eds.), **The Proterozoic Biosphere**. Cambridge University Press, New York, p. 295–297, 1992.

FAWLEY, M. W. Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). **Journal of Phycology**, v.20,p. 67-72, 1984.

FENTON, O.; HUALLACHÁIN, D. O. Agricultural nutrient surpluses as a potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. **Algal Research**, v. 1, p. 49-56, 2012.

FERRAGUT, C.; LOPES, M.R.M.; BICUDO, D.C.; BICUDO, C.EM.M; VERCELLINO, I.S. Ficoflórua perifítica e planctônica (exceto Bacillariophyceae) de um reservatório oligotrófico raso (Lago do IAG, São Paulo). **Hoehnea** v.32, n 2, p. 137-184, 2005.

FERRERO, G.O.; ALMEIRA, M.F.; ALVIM-FERRAZ, M.C. M.; DIAS, J. M. Water-free process for eco-friendly purification of biodiesel obtained using a heterogeneous Ca-based catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 121, p. 114-118, 2014.

FIDALGO J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*, **Aquaculture**, v. 166, p. 105 – 116, 1998.

FIGUEIREDO, M. C. B.; ARAÚJO, L F. P.; ROSA, M. F.; MORAIS, L. F. S.; PAULINO, W. D.; GOMES, R. B. Impactos ambientais do lançamento de efluentes da carcinicultura de águas interiores. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11,p.231-240, 2006.

FLYNN, K.J.; SYRETT, P.J. Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v.90, p. 151-158,1986a.

FLYNN, K.J.; SYRETT, P.J. Utilization of L-lysine and L-arginine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*.**Marine Biology**,v. 90, p. 159-163. 1986b.

FOUAD, Y.O.A., KONSOWA, A.H., FARAG, H.A., SEDAHMED G.H. Performance of an electrocoagulation cell with horizontally oriented electrodes in oil separation compared to a cell with vertical electrodes. **Chemical Engineering Journal**, v. 145, n. 3, p. 436–440, 2009.

FRANCISCO, E.C.; FRANCO, T.T.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPEZ, E. From waste-to-energy: the process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, p. 482-487, 2015.

FRANCO, A. L. C.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; ALMEIDA FUKUDA, N.; HABE, H.; ITO, M.; Biodegradation of biodiesel wash water from a biodiesel fuel production plant. **Journal of Oleo Science**, v. 62, n. 7, p. 525-532, 2013.

GAN, K.; MOU, X.; XU, Y.; WANG, H. Application of ozonated piggery wastewater for cultivation of oil-rich *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v.171, p. 285-290, 2014.

GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER, G.; TIWARI, O. N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

GOLDEMBERG, J.; LUCON, O. Energia, Meio Ambiente e Desenvolvimento. 3.ed. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GOLDMAN, J. C. Physiology aspects in algal mass cultures. In: Shelef, G. Soeder, C. J.(Ed.), Algae Biomass, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, p. 343-359, 1980.

GOLDMAN, J. C.; RYTHER, J. H.; DENNET, M. R. The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.57, p. 1, p.15-24, 1982.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. Biotechnological potential of *Synechocystis salina* co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production. **Bioresource Technology**, v. 200, p.279-286, 2016.

GONG, Y.; JIANG, M. Biodiesel Production with Microalgae as Feedstock: from Strains to Biodiesel. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1269-1284, 2011.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, E.; MAESTRINI, S. Y. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. **Aquaculture**, v. 36, p. 245-256, 1984.

GRANGEIRO, R.V.T **Caracterização da água de lavagem proveniente da purificação do biodiesel**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

GRANGEIRO, R.V.T.; MELO, M.A.R.; SILVA, E.V.; SOUZA, A.G.; TOSCANO, I.A.S. Caracterização física, química e toxicológica da água de lavagem gerada na produção de biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 9, n. 1, n. 78 – 83, 2014.

GRASSHOFF, K. (Ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie: Weinheim. ISBN 3-527-25631-8. XIV, p. 317, 1976.

GRASSHOFF, K.; EHRHARDT, M.; REMUNG, K. *Methods of seawater analysis*. 2nd revised and extended ed. Weinheim, Verlag Chemie. 419 p, 1983.

GREEN, F. B.; LUNDQUIST, T.J.; QUINN, N.W.T.; ZARATE, M.A.; ZUBIETA, I.X.; OSWALD, W.J. Selenium and nitrate removal from agricultural drainage using the AIWPS® technology. **Water Science Technology** , v.48, p.299–305, 2003.

GRIFFITHS, D. J. Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory culture of diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Marine Biology**, v.21, n. 2, p.91-97, 1973.

GRIMA, E.M.; BELARBI, E.H.; FERNADEZ, F.G.A. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, 491, 2003.

GROOM, M. J.; GRAY, E.M.; TOWNSEND, P.A. Biofuels and biodiversity: principle for creating better policies for biofuel production. **Conservation Biology**, v. 22, p- 602–9, 2008.

GUILLARD R. R. L.; LORENZEN C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide c. **J. Phycology**, v. 8, p. 10-14, 1972.

GUIMARÃES, I.M. Utilização de ostra e macroalga como biofiltro para efluentes de cultivo de camarão marinho. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós— Graduação em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

GUILLARD, R. R. L.; R YTHER, J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* (Cleve) Gran. Canadian **Journal of Microbiology**, v. 8, p. 229-239, 1962.

GUPTA, A.; VERMA, J.P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p.550-567, 2015.

GUTZEIT, G.; LORCH, D.; WEBER, A.; ENGELS, M.; NEIS, U. Bioflocculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science Technology*, v. 52, p.9–18, 2005.

HARGRAVES, P. E.; FRENCH, F. Observation on the survival of diatom resistant spores. **Nova Hedwigia**, v.53, p.229-239, 1975.

HARMEL, R.D.; S. QIAN, K.; RECKHOW, P.; CASEBOLT. The MANAGE database: Nutrient load and site characteristic updates and runoff concentration data. *Journal Environmental Quality*, n. 37, p. 2403-2406, 2008.

HEMKEMEIER, M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

HERNÁNDEZ, D.; RIAÑO, B. .; COCA, M.; SOLANA, M.; BERTUCCO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.C. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. ***Chemical Engineering Journal***, v. 285, p. 449-458, 2016.

HO, S.H.; CHAN, M.C.; LIU, C.C.; CHEN, C.Y.; LEE, W.L.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. ***Bioresource Technology***, v. 152, p. 275–282, 2014.

HO, S.H.; CHAN, M.C.; LIU, C.C.; CHEN, C.Y.; LEE, W.L.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. ***Bioresource Technology***, v. 152, p. 275–282, 2014.

HOFFMAN, P. Wastewater Treatment With Suspended and Nonsuspended Algae. *Journal of Phycology*, v. 34, p.757–763, 1998.

HOWARTH, R. W. An assessment of human influences on fluxes of nitrogen from the terrestrial landscape to the estuaries and continental shelves of the North Atlantic Ocean. ***Nutrient Cycling in Agroecosystems***, v. 52, p. 213–223, 1998.  
<http://www.algenolbiofuels.com>. Acessado em 3/08/2014.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. ***The Plant Journal***, v.54, p. 621–639, 2008.

HUSSAIN I.; HANJRA, M.A. Does irrigation matter for poverty alleviation: review of the empirical evidence. Unpublished report, International Water Management Institute, Colombo, Sri Lanka, 2003.

HUSSAIN, I.; HANJRA, M.A. Irrigation and poverty alleviation: review of the empirical evidence. ***Irrigation and Drainage***, v. 53, n. (1), p. 1–15, 2004.

HYKA, P.; LICKOVA, S.; PRIBYL, P.; MELZOCH, K.; KOVAR, K. Flow cytometer for development of biotechnological process with microalgae. ***Biotechnology Advances***, v. 31, p. 2-16, 2013.

ICMBio. Plano de Manejo: APA da Barra do Rio Mamanguape; ARIE de Manguezais da Foz do Rio Mamanguape, Brasília, 2014.

ISIDORO, D.; QUILEZ, D.; ARAGUES, R. Environmental impact of irrigation in La Violada District (Spain): II nitrogen fertilization and nitrate export patterns in drainage water. ***Journal of Environmental Quality***, v. 35, p. 776-785, 2006.

JACKSON, C.; PRESTON, N.P.; THOMPSON, P.; BURFORD, M. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. **Aquaculture**, V. 218, p. 397-411, 2003.

JONES, A. B.; DENNISON, W. C.; PRESTON, N. P. Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. **Aquaculture**, v. 193, p. 155-178, 2001

JORRY, D. Status, Issues and Perspectives of the Global Shrimp Farming Industry: Opportunities for U.S. Shrimp Producers. Indiana Indoor Shrimp Production Brainstorming Session, Indiana Soybean Alliance, Indianapolis. **Commercial Aquaculture**, 2014.

KHAN, S.; HANJRA, M.A Footprints of water and energy inputs in food production – Global perspectives. **Food Policy**, n. 34, p. 130–140, 2009.

KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista Biológica Brasileira**, v.2, n.1, p. 23-38, 1990.

KOLESÁROVÁ, N.; HUTNAN, M.; BODÍK, I.; SPALKOVÁ, V. Utilization of biodiesel by-products for biogas production. **J. Biomed. Biotechnol.** p. 1-15, 2011.

KORMAS, K. A. Bacterioplankton growth on extracellular organic carbon from marine microalgal cultures. **Cahiers Biologie Marine**, v. 46, n. 3, p. 241-251, 2005.

KOTAK, B.G.; S.L. KENEFICK; D.L FRITZ.; ROUSSEAUX, C. G.; PREPAS, E. E.; HRUDEY, S. E. Occurrence and toxicological evaluation of cyanobacterial toxins in Alberta lakes and farm dugouts. **Water Research**, v. 27, p. 495–506, 1993.

KOTHARI, R.; PRASAD, R.; KUMAR, V.; SINGH, D.P. Production of biodiesel from microalgae *Chlamidomonas popyrenoideum* grown on dairy industry wastewater **Bioresource Technology**, v. 144, p. 499-503, 2013.

KUMJADPAIS.; NGAMLERDPOKIN, K.; CHATANON, P.; LERTSATHITPHONGS, P.; HUNSOM, M. Management of fatty acid methyl ester (FAME) wastewater by a combined two stage chemical recovery and coagulation process. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 89, p. 369-376, 2011.

KUNIMATSU, T.; SUDO, M Characteristics of stream water quality stream and runoff of pollution load from forest. **Lake Biwa Res Inst**, v.14, p.6–15, 1997.

LACERDA, L. D. Inputs of nitrogen and phosphorus to estuaries of northeastern Brazil from intensive shrimp farming. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 10, n. 2, p. 13-27, 2006.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V.; VAISMAN, A. G.; MAIA, S. R. R.; AGUIAR, J. E.; DIAS, F. J. S. Contaminação dos metais pesados nas bacias inferiores dos rios Curimataú e Açú (RN) e rio Jaguaribe (CE) In: Impacto do ambiente Exógeno sobre a Carcinicultura Marinha. Associação Brasileira dos Criadores de Camarão (ABCC), Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR-UFC), Sociedade Internacional para Ecossistemas de Manguezal (ISME-BR). Fortaleza, 2004.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues , problems and the way forward. **Biotechnology Resource**, v. 30, p. 673-690, 2012.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): win-win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 124-41, 2011.

LAMERS, A. **The characterization of biodiesel wash water and the potential for microbial remediation**. MsC Thesis, Univ. Guelph, Faculty of Graduate Studies, 143p, 2010.

LANG, I.; HODAC, L.; FRIEDL, T.; FEUSSNER, I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1 p. 124, 2011.

LEITÃO, R.C.; CAVALCANTE, R.R.R.; RIBEIRO, E.M., CLAUDINO, R.L., MACIEL, N.M.; ROSA, M.F. Reuso da água da despesca na produção de camarão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v.15, n.12, p.1314-1320, 2011.

LEITE, G.B.; ABDELAZIZ, A.E.; HALLENBECK, P.C. Algal biofuels: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, 145:134-141, 2013.

LELONG, A.; HEGARET, H.; SOUDANT, P. Cell-based measurements to assess physiological status of *Pseudo-nitzschia multiseries*, a toxic diatom. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 969-981, 2011

LEVINE, R. B.; COSTANZA-ROBINSON, M. S.; SPATAFORA, G. A. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.1, p. 40-49, 2011.

LIANG, G.; MO, Y.; ZHOU, Q. OPTIMIZATION OF DIGESTED CHICKEN MANURE FILTRATE supplementation for lipid overproduction in heterotrophic culture *Chlorella protothecoides*. **Fuel**, v.108, p. 159-165, 2013.

LIANG, K.; ZHANG, Q.; GU, M.; CONG, W. Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. **Journal Applied of Phycology**, v. 5, p. 311-318, 2012.

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

LIN, Y. F.; JING, S. R.; LEE, D. Y. The potential use of constructed wetlands in a recirculating aquaculture system for shrimp culture. **Environmental Pollution**, v.123, p.107-113, 2003.

LIU, S.; ZHU, Z.; FAN, C.; QIU, Y.; Zhao, J. Seasonal variation effects on the formation of trihalomethane during chlorination of water from Yangtze River and associated cancer risk assessment. **Journal of Environmental Sciences**, v.23, n.9, p.1503-1511, 2011.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L.C.; CRUZ, R.S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1596-1608, 2009.

LOLADZE, I.; ELSER, J. J. The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio. **Ecology Letters**, v. 14, n. 3, p. 244-250, 2011.

LOMBARDI, A. T. Influência de fósforo e sílica na produção de lipídios por células de *Chaetoceros gracilis* cultivadas em cultura contínua tipo “cage” turbidostato. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. **Mar. Biol.**, 94: 489-497, 1990.

LOPES-MUÑOZ, I.; ABALDE, J.; HERERRO, C. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidades de luz. **Nova Acta Científica Compostelana**, v. 3, p. 59– 65, 1992.

LÓPEZ, J.A.S.; SANTOS, M.A.M.; PÉREZ, A.F.C.; MARTIN, A.M. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. **Biosource Technology**, v. 100, p. 5609-5615, 2009.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U, M, L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture** v. 148, p. 153-158, 1997.

LOZANO, N.P.P. Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo.

LU, W.; WANG, Z.; WANG, X.; YUAN, Z. Cultivation of *Chlorella* sp. using raw dairy wastewater for nutrient removal and biodiesel production: Characteristics comparison of indoor bench-scale and outdoor pilot-scale cultures. **Bioresource Technology**, v.192, p. 382-388, 2015.

LUDWIG, A.; MATLOCK, M.; HAGGARD, B.E.; MATLOCK, M.; CUMMINGS, E. Identification and evaluation of nutrient limitation on periphyton growth in headwater streams in the Pawnee Nation, Oklahoma, **Ecological Engineering**, v. 32, p. 178–186, 2008.

MAITY, J. P.; BUNDSCHUH, J.; CHEN, C.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. **Energy**, p. 1-10, 2014..

MARKAGER, S.; VICENT, W. S.; TANG, E. P. Y. Carbon fixation by phytoplankton in high Arctic lakes: Implications of low temperature for photosynthesis. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 3, p. 497-607, 1999.

MARKOU, G; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green-algae) in agro-industrial waste and wastewaters: A review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.

MARKOU,G., ICONOMOU D., MUYLAERT, K. Applying raw poultry litter leachate for the cultivation of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**, v.13, p. 79-84, 2016.

MARTINS, G. B. Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas fitoplanctônicas. Dissertação do Programa de pós-graduação em biologia vegetal. Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

MATAMOROS, V.; GUTIÉRREZ, R.; FERRER, I.; GARCÍA, J.; BAYONA, J. M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study. **Journal of Hazardous Materials**, v.288, p. 34-42, 2015.

MATAMOROS, V.; RODRIGUEZ, Y. Batch vs continuous-feeding operational mode for the removal of pesticides from agricultural run-off by microalgae systems: A laboratory scale study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 309, p. 126-132, 2016.

MEA. General Synthesis Report: Ecosystems and Human Well-being. MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Island Press, Washington, 2005.

MELO, G.; SASSI, R.; ARAÚJO, T. F. H. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura. **Revista Nordestina de Biologia**, v.1, p. 45-53, 1993.

MENEZES, R.S; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.M.; ANTONOISI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 13, n.1, p. 10-15, 2013.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

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

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A.G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M.C.; MILLI, B. B.; GRIPPA, D. C.; SIMONELLI, G. Aplicações alternativas da glicerina oriunda do biodiesel. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.2, 2011.

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

MONTERO, M.F.; ARISTIZÁBAL, M.; REINA, G.G. Isolation of High-Lipid Content Strains of the Marine Microalgae *Tetraselmis suecica* for Biodiesel production by Flow Cytometry and Single-Cell Sorting, **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1053-1057, 2011.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1349-1361, 2015.

MOREIRA, R. R. N.; CAMPOS, Y. C.; GUILARTE, E. O.; GONDRES, R.; TRISTÁ, C. M.; MARTÍNEZ, J. Cinética de degradación del naftaleno por células inmovilizadas húmedas de

Bacillus alcalophilus cepa IDO-225. **Revista CENIC Ciências Biológicas**, v. 35, n. 2, p. 77-82, 2004.

MORRIS, I.; CLOVER, H. E. Questions on the mechanism of temperature adaptation in marine phytoplankton. **Marine Biology**. v.24, p.147-154, 1974.

MOURA, R. N.; SOUZA JÚNIOR, J.; FARIAS, W. R. L. Reutilização de água em um sistema integrado com camarões, sedimentação, ostras e macroalgas marinhas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 4, p. 540-547, 2008.

MPA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Brasil, MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura Brasília, DF, Brasil, 2011.

MULBRY, W.; KONDRAD, S.; PIZARRO, C.; KEBEDE-WESTHEAD, E. Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers, **Bioresource Technology**, v. 99, p8137–8142, 2008.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, v. 40, p. 2799–2815, 2006.

NAGARAJAN, M.; MARUTHANAYAGAM, V.; SUNDARARAMAN, M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. **Journal of Applied Toxicology**. V. 32, p. 153–185, 2012.

NAKANISHI, M.; MONSI, M. Effects of variation in salinity on photosynthesis of phytoplankton growing in estuaries. **Journal of the Faculty of Science**, v. 9, n. 2, p. 19-42, 1965.

NARAYANAMOORTHY, A.; HANJRA, M. Rural infrastructure and agricultural output linkages: a study of 256 Indian districts. **Indian Journal of Agricultural Economics**, v. 61, n.3, p. 444–459, 2006.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B. DOS.; PREVIERO, T. DE C.; VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A.H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações Econômicas** v.41, n. 2. P. 61-73, 2011.

NECHAMA Z.; RUSHANSKY, M.; LEGRAND, C. Excretion of dissolved organic carbon by phytoplankton of different sizes and subsequent bacterial uptake. **Marine Ecology Progress Series**, v.132, p. 249-255, 1996.

NELSON J.R.; GUARDA S.; COWELL L.E.; HEFFERNAN P.B. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30°C, **Aquaculture**, v. 106, p. 357 – 377, 1992.

NEORI, A.; SHPIGEL, M.; BEN-EZRA, D. A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. **Aquaculture**, v. 186, p. 279-291, 2000.

NETO, J. A.; MENEZES, R. S. Biodiesel de microalgas: Avanços e desafios. **Química nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

NÓBREGA, G.N.; FERREIRA, T.O.; ROMERO, R.E.; MARQUES, A.G.B.; OTERO, X.L. Iron and sulfur geochemistry in semi-arid mangrove soils (Ceará, Brazil) in relation to seasonal changes and shrimp farming effluents. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 9, p.7393–7407, 2013.

NORIEGA, C; ARAÚJO, M. Nitrogen and phosphorus loading in coastal watersheds in northeastern Brazil. **Journal of Coastal Research. Special**, n. 56, p. 871 – 875, 2009.

NOUREDDINI, H.D.Z. Kinetics of tranesterification of soybean oil. **Biocatalysis Articles**, v. 74, n.11, p. 1457-1463, 1997.

O'CONNOR, W. A.; NELL, J. A.; DIEMAR, J. A. The evaluation of twelve algal species as food for juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley). **Aquaculture**, v.108, p. 277-283, 1992.

OENEMA, O.; WRAGE ,N.; VELTHOF, G.L.; VAN GROENIGEN ,J.W.; DOLFING, J.; KUIKMAN, P.J. Trends in global nitrous oxide emissions from animal production systems. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.72, p51-65, 2005.

OHKUBO, T.; AZUMA, Y. 2005. Load of turbid from the watershed of Lake Biwa and its effect on the lake water quality. Memorial Volume of the Lake Biwa Research Institute, p. 55–72, 2005.

OJEDA, A.; AFONSO, A. Estudio comparative del crecimiento y composicion de tres especies fitoplanctonicas utilizando cuatro fuetes de nitrogeno. **Informes Tec. Inst.Esp. Oceanogr. Madrid**, v. 45, p. 4-11, 1986.

OKAUCHI, M.; HIRANO, Y. Nutricional value of *Tetraselmis tetrathele* for larvae of *Penaeus japonicus*. **Bulletin of National Research Institute of Aquaculture**, 9: 29-33, 1986.

OLIVEIRA, A. A.; KOENING, M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 27, n.3, p. 293-298, 1984.

OSUNDEKO, O.; PITTMAN, J. K. Implications of sludge liquor addition for wastewater-based open pond cultivation of microalgae for biofuel generation and pollutant remediation, **Biosource Technology**, v. 152, p. 355-363. 2014.

OSWALD, W.; GOTAAS, H.; LUDWIG, H.; LYNCH, V. Algae symbiosis in oxidation ponds: III. Photosynthetic oxygenation. **Sewage Indust Wastes**, v 25, p. 692–705, 1953.

PÁEZ-OSUNA, F.; GRACIA, A.; FLORES-VERDUGO, F.; LYLEFRITCH, L.P.; ALONSO-RODRÍGUEZ, R.; ROQUE, A.; RUIZFERNÁNDEZ, A.C. 2003. Shrimp aquaculture and the environment in the Gulf of California ecoregion. 806-815, 2003.

PÁEZ-OSUNA, F.; GUERRERO-GALVÁN, S.R.; RUIZFERNÁNDEZ, A.C. Discharge of nutrients from shrimp farming to coastal waters of the Gulf of California. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p.585-592, 1999.

PALOMINO-ROMERO, J. A.; LEITE, O. L.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; SILVA, D. P.; CAVALCANTI, E. B. Tratamentos dos efluentes gerados na produção de Biodiesel. **Química Nova**, v. 35, n.2, p. 367-378, 2012.

PANIAGUA-MICHEL, J.; GARCIA, O. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluente using constructed microbial mats. **Acquaculture Engineering**, v. 28, n. 3-4, p. 131-139, 2003.

PANIAGUA-MICHEL, J.; GARCIA, O. Ex-situ bioremediation of shrimp culture effluente using constructed microbial mats. **Acquaculture Engineering**, v. 28, n. 3-4, p. 131-139, 2003.

PANIZZA M., CERISOLA, G. Olive mill wastewater treatment by anodic oxidation with parallel plate electrodes. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1179–1184, 2006.

PARK, Y.; JE, K-W.; LEE, K.; JUNG, S-E.; CHOI, T-J. Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by coinoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. **Hydrobiologia**, v. 598, p. 219–28, 2008.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M, F.; JACOB-LOPES, E.; COLEPICOLO NETO, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M, F.; JACOB-LOPES, E.; COLEPICOLO NETO, P. Biodiesel renovável derivado de microalgas avanços e perspectivas tecnológicas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J-P.; BASHAN, Y. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Phycology**, v.46, p.800–12, 2010.

PIENKOS, P. T.; DARZINS, A. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. John Wiley & Sons, Ltd. I. 3:431–440, 2009.

PINDICH, R.; RUBENFELD, D. *Econometric models and economic forecasts*. 2 ed. **New York: Mc Graw-Hill**, p. 492, 1981.

PITTIMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. The potential os sustaintable algal biofuel production using wastewater resource. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 17-25, 2011.

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopatologia**, v. 90, p. 129-139, 1985.

PRANDINI, J.M.; SILVA, M. L. B.; MEZZARI, M. P.; PIROLI, M.; MICHELON, W.; SOARES, H. M. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67-75, 2016.

PRIMAVERA, J.H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean and Coastal Management**, v. 49, n. 9, p. 531–545, 2006.

PYLE, D.J., GARCIA, R.A., WEN, Z. Producing DHA rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.56, n. 11, p. 3933-3939, 2009.

QUARMBY, L. M.; TURPIN, D. H.; HARRISON, P. J. Physiological responses of two marine diatoms to pulse additions of ammonium. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.63, n. 2, p. 173-182, 1982.

QURASHI, F.O; SPENCER, C.P, Studies on the growth of some marine unicellular algae under different artificial light sources, **Marine Biology**, v. 8, n 1, p. 60-65,1971.

RAIMBAULT, P. Effect of temperature on nitrite excretion by three marine diatoms during nitrate uptake. **Marine Biology**, v. 92, n.2, p.149-155, 1986.

RAIMBAULT, P. Influence of temperature on the transient response in nitrate uptake and reduction by four marine diatoms. **Marine Biology**. Ecol. v. 84, p.37-53, 1984.

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

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

RANDALL, G.W.; DELGADO, J.A.; SCHEPERS, J.S. Nitrogen Management to Protect Water Resources. In Nitrogen in Agricultural Systems, eds. J.S. Schepers and W.R. Raun, 911-945. Agronomy Monograph 9. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2008.

RASMUSSEN, M. Primary biomass production from marine algae. University of Aarhus: **National Environmental Research Institute**; Memorandum for VE-net, 2007.

RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444-467, 2013.

REDFIELD, A. C. On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In Daniel, R.J. [Ed.] James Johnstone Memorial Volume. University Press of Liverpool, pp. 177-92, 1934.

RIBEIRO, L. F.; SOUZA, M. M.; BARROS, F.; HATJE, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. **Journal of integrated coastal zone management**, v. 14, n. 3, p. 365-383, 2014.

RIJSTENBIL, W. Selection of phytoplankton species in culture by gradual salinity changes. **Neth. Journal of Sea Research**, v. 2, n. 3, p. 291-300, 1988.

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

ROBERTS, G. W.; FORTIER, M. P.; STURM, B. S. M.; STAGG-WILLIAMS, S. M. Promising pathway for algal biofuels through wastewater cultivation and hydrothermal conversion. **Energy Fuels**, v. 27, p. 857–67, 2013.

ROCHA, I. P. Shrimp Farming In Brazil Burgeoning Industry Recovering, Future Holds Potential. **Global aquaculture advocate**, p: 43-45, 2010

ROCKSTROM, J.; LANNERSTAD, M.; FALKENMARK, M. Assessing the water challenge of a new green revolution in developing countries. **PNAS**, v. 104 , n. 15, p. 6253–6260, 2007.

RODRIGUES, J.; BORBA, M. Carcinicultura Brasileira: Estatísticas e Revelações, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2013.

SAMORI, G.; SAMORI, 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, p. 791-801, 2013.

SANDU, S. I.; BOARDMAN, G. D.; WATTENC, B. J.; BRAZIL, B. L. Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filters with a plastic beans medium. **Aquacultural Engineering**, v.26, p.41-59, 2002.

SANDUN, F.; SUSHIL, A.; KIRAN, K.; RANJITHA, B. Glycerol based automotive fuels from future biorefineries. **Fuel**, v.86, p. 2806–2809, 2007.

SANTOS, R.R.; ARAÚJO, O. Q. F.; MEDEIROS, J. L.; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v.204, p.38-48, 2016.

SASSI, P. G. P.; ABRAHÃO, R.; CALIXTO, C. D.; SANTANA, J. K. S. Cultivo de *Lagerhemia longiseta* (LEMMERMANN) PRINTZ, 1914 em efluentes de usina de biodiesel. In: Anais do 9º Congresso Internacional de Bioenergia, 2014.

SAUODIS-HELIS, L.; DUBACQ, J. P.; MARTY, Y. SAMAIN, J. F. GUDIN C. Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis* aff. *galbana* clone T. isso. **Journal applied to phycology**, v. 6, p. 315–322, 1999.

SAVIDGE, G. Growth and photosynthetic rates of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin in a cyclical light field. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.100, n.1-3, p. 147-164, 1986.

SAWAENGSACK, W.; SILALERTRUKSA, T.; BANGVIWAT, A.; GHEEWALA, S. H. Life cycle cost of biodiesel production from microalgae in Thailand. **Energy for Sustainable Development**, v. 18, p. 67-74, 2014.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M.; Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SCHOBERT, C. L. Proline catabolism, relaxation of osmotic strain and membrane permeability in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Physiology Plant Journal**, v.50, p. 37-42, 1980.

SCHRÖDER, J.J.; D. SCHOLEFIELD, F. CABRAL.; G. HOFMANS. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. *Environmental Science and Policy*, v. 7, n. 1, p. 15-23, 2004.

SCOTT, A. P.; BAYNES, S. M. Effects of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture**, v.14, n.3, p. 247-260, 1978.  
SEI, A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland, 2009.

SHAH, G.; SYRETT, P. J. Uptake of guanine by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Phycology**., v.15, n. 4, p. 353-362, 1982.

SHARMA, G. K.; KHAN, S.A. Bioremediation of Sewage Wastewater Using Selective Algae for Manure Production. **International Journal of Environmental Engineering and Management**, v. 4, n. 6, p. 573-580, 2013.

SHARP, J. H; UNDERHILL, P. A; HUGHES, D. Interaction (allelopathy) between marine diatoms: *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Journal of Phycology**. v.15, p.353–362, 1979.

SHARPLEY, A.N.; DANIEL T.; GIBSON, G.; BUNDY, L.; CABRERA, M.; SIMS, T.; STEVENS, R.; LEMUNYON, J.; KLEINMAN, P.; PARRY, R. Best Management Practices To Minimize Agricultural Phosphorus Impacts on Water Quality. U.S. Department of Agriculture, **Agricultural Research Service**, ARS–163, 50 pp, 2006.

SHELDRIK, W. F.; SYERS, J. K.; LINGARD, J. A conceptual model for conducting nutrient audits at national, regional, and global scales, **Nutrition Cycle Agroecosystem**, v. 62, p. 61–72, 2002.

SHIMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista Ciatec**, v. 4, p. 48-60, 2012

SHIMURA, S.; SHIBUYA, H. & ICHIMURA, S. Growth and photosynthesis properties of some planktonic marine diatoms at various salinity regimes. *Mer*, Tokyo, v.17, p.149-155, 1979.

SIGAUD, T. C. S. **Efeitos de temperatura e salinidade sobre as respostas de crescimento e o conteúdo de clorofila-a de algumas espécies de algas planctônicas, em cultura**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 352p, 1990.

SILVA, L.F. Solos tropicais: Aspectos pedológicos, ecológicos e de manejo. São Paulo: **Terra Brasilis Editora**, 137p, 1996.

SILVESTRE, L.C.; FARIAS, D.L.S.; LOURENÇO, J.D.S.; BARROS, S.C.A.; BRAGA, N.M.P. Diagnóstico dos impactos ambientais advindo de atividades antrópicas na APA da barra do Rio Mamanguape. **Enciclopédia Biosfera, Centro Conhecer Científico**, v. 7, n. 12, 2011.

SIMON, C. M. The culture of the diatom *Cheateoceros gracilis* and its use as food for penaeid protozoal larvae. **Aquaculture**, v.14, n. 2, p. 105-113, 1978.

SINGH, J.; THAKUR, I. S. Evaluation of cyanobacterial endolith *Leptolyngbya* sp. ISTCY101, for integrated wastewater treatment and biodiesel production: A toxicological perspective. **Algal Research**, v. 11, p. 294-303, 2015.

SIVA KIRAN, R.R.; MADHU, G.M.; SATYANARAYANA, S.V.; BINDIYA, P. Bioaccumulation of Cadmium in Blue Green Algae *Spirulina* (*Arthrospira*). **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, n. 3, p. 1-4, 2012.

SOUTHGATE, P.; BEER, A. C.; DUNCAN, P. F.; TAMBURRI, R. Assessment of nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeastbased diet for larvae of the blacklip pearl oyster, *Pineta margaritifera* (L.). **Aquaculture**, v. 162, p. 247-257, 1998.

SRIRANGSAN, A., ONGWANDEE, M., CHAVALPARIT, O. Environ, Treatment of biodiesel wastewater by electrocoagulation process. **Journal Enviromental Asia**, v. 2, p. 15–19, 2009.

STAUBER, J. L.; FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S. Application of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. **Trends in Biotechnology-Cell Press**, v. 20, n. 4, p. 141-143, 2002.

STEIN, J.R. (ed.). Handbook of Phycological Methods: culture methods and growth measurements. Cambridge: Cambridge University, p. 448, 1973.

SUBASHCHANDRABOSE, S.R.; RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 896–907, 2011.

SUEHARA, K.; KAWAMOTO, Y.; FUJII, E.; KOHDA, J.; NAKANO, Y.; YANO, T. Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v, 100, n. 4, p. 437–442, 2005.

SUKENIK, A.; YAMAGUCHI, Y.; LIVNE, A. Alteration in lipid molecular species of marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp., **Journal of Phycology**, v. 29, p. 620-626, 1993.

SUKIAS, J.P.S.; CRAGGS, R.J.; TANNER, C.C.; DAVIES-COLLEY, R.J.; NAGELS, J.W. Combined photosynthesis and mechanical aeration for nitrification in dairy waste stabilisation ponds. **Water Science Technology**, v. 48, p. 137–44, 2003.

TABCHE, L.M.; GALAR MARTINEZ, M.; OLVERA HERNÁNDEZ, E.; CHEUE ROMERO, A.; LÓPEZ LÓPEZ, E.; PROAL NÁJERA, J.B. Captación de matalión em sedimentos artificiales y su efecto tóxico sobre *Limnodrilus hoffmeisteri*. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 17, n.3, p. 137-146, 2001.

TALAMONI, J. L. B.; SILVA, F. H.; CÁCERES, O. Composição primária dos polissacarídeos de *Microcystis aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin (Cyanophyceae). In: Resumos do Encontro Brasileiro de Plâncton, p. 31, 1988.

TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S.; SIMPSON, C. G. Removal of Copper and Immobilized Microalga, *Chlorella Vulgaris*. In: Wong, Y. S. e Tam, N.F.Y. *Wastewater Treatment with Algae*. Springer-Verlag, v. 2, p. 17-36. 1998.

TAMER, E.; AMIN, M.A.; OSSAMA, E.T.; BO, M.; BENOIT, G. Biological treatment of industrial wastes in a photobioreactor. *Water Science Technology*, v. 53, p.117–25, 2006.

TANCREDO, K.R.; NOBREGA, T.O.; DIAS, T.; LAPA, K.R. Impactos Ambientais da Carcinicultura Brasileira. **3rd International Workshop Advances in Cleaner Production**, São Paulo, May, p. 1-7, 2012.

*Tecnogestón. Una mirada al ambiente*. v. 11, n. 1, p. 51-55, 2005.

TEIXEIRA, C.; VIEIRA, A. H. A. Nutrient experimento using *Phaeodactylum tricornutum* as an assay organismo. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, v. 25, n.1, p. 29-42, 1976.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Biodiesel o novo combustível do Brasil*, n.6, p.91–96, 2007.

TEIXEIRA, C.M.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. *Biodiesel o novo combustível do Brasil*, p.91-96, 2008.

TERCERO, E. A. R.; DOMENICALI, G.; BERTUCCO, A. Autotrophic production of biodiesel from microalgae: An updated process and economic analysis. **Energy**, v. 76, p. 807-815, 2014.

THOMAS, Y.; COURTIES, C.; EL HELWE, Y.; HERBLAND, A.; LEMONNIER, H. Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia lagoon. *Marine Pollution Bulletin*, v. 61, p. 387–398, 2010

THOMPSON, S. C. G.; BARTON, M. A. Ecocentric and anthropocentric attitudes toward the environment. *Journal of Environmental Psychology*, v. 14, p. 149-157, 1994.

TILLNER, J.; HOLLARD, C.; BACH, C.; ROSIN, C.; MUNOZ, J.; DAUCHY, X. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their chlorination by-products in drinking water and the coatings of water pipes by automated solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1315, p. 36-46, 2013.

TILMAN D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, v. 292, p.281–284.2001.

TOI, H. T.; BOECHX, P.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V. Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to mono-diets, as demonstrated by a <sup>15</sup>N isotope uptake laboratory study, *Aquaculture*, v. 422-423, p. 109-114, 2014.

TOI, H. T.; BOECHX, P.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V. Co-feeding of microalgae and bacteria may result in increased N assimilation in *Artemia* as compared to

mono-diets, as demonstrated by a  $^{15}\text{N}$  isotope uptake laboratory study, *Aquaculture*, v. 422-423, p. 109-114, 2014.

TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; COSTA, R. A. Extrato de lixo urbano como fonte de nutrientes para cultivo de *Skeletonema costatum* Grev. (Cleve). **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (Passagro-Rio)**, Rio de Janeiro, p. 3, 1984.

TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; RODRIGUES, P. C. Extrato de lixo urbano para culturas externas em larga escala de *Tetraselmis chunii* Butcher. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (Passagro-Rio)**, Rio de Janeiro p. 5, 1986.

TURRAL, H.; BURKE, J. Sustainable crop production and intensification in irrigated cropping systems. Land and Water Division, FAO, Rome, 2010.

VALDERRAMA, D.; ANDERSON, J. L. Shrimp Production Review. Global Outlook Aquaculture LeaderShip. Santiago, 2011.

VALENZUELA, E. E.; MILLÁN, N R.; NÚÑEZ, C. F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *Galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p. 207 - 216, 2002.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; BOREEN, G.; BOON, N.; VERVAEREN, H. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 159, p. 342-354, 2014.

VAN DEN HENDE, S.; BEELEN, V.; BOREEN, G.; BOON, N.; VERVAEREN, H. Up-scaling aquaculture wastewater treatment by microalgal bacterial flocs: From lab reactors to an outdoor raceway pond. *Bioresource Technology*, v. 159, p. 342-354, 2014.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFEELS, R. H.; BARBOSA, M, J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142-149, 2013.

VARFOLOMEEV, S. D.; WASSERMAN, L. A.; Microalgae as source biofuel, food, fodder, and medicines, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 789-807, 2011.

VELJKOVIC, V.B.; STAMENKOVIC, O.S.; TASIC, M.B. The wastewater treatment in the biodiesel production with alkali-catalyzed transesterification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,, 32, 40-60, 2014.

VIEIRA A. A. Métodos de culturas de algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e Ubatuba – SP. **Boletim Inst. Oceanogr.**, São Paulo, v.26, n. 2, p. 303-338, 1977.

VIEIRA, A. A. H. Estudos experimentais em fitoplâncton marinho. Culturas e aspectos ecofisiológicos. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 162p, 1975.

VIEIRA, A. A. H. Excreção de matéria orgânica dissolvida por populações fitoplanctônicas marinhas. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico. 160p, 1980.

VIEIRA, A. A.; TUNDISI, J. Cultivo de fitoplâncton lacustre no Departamento de Ciências Biológicas. In: **Resumo do Simpósio Brasileiro de Aquicultura**, Recife, PE, UFPE, p.17, 1978.

VONSHAK, A. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Boca Raton: CRC, p. 117-145. 1990.

VYMAZAL, J.; BREZINOVÁ, T. The use of constructed wetlands for removal of pesticides from agricultural runoff and drainage: a review, **Environment International**, v. 75, p. 11–20, 2015.

WALKER, J. D.; COLWELL, R. R.; PETRAKIS, L. Degradation of Petroleum by an Alga, *Prototheca Zopfii*. **APPLIED Microbiology**, July 1975, P. 79-81, 1975.

WALNE, P. R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. **Invest. Ser.II**, v.26, n. 5, p. 62, 1970.

WALSH, D.T.; WITHSTANDLEY, C.A.; KRAUS, R.A.;PETROVITS, B.J. Mass culture of selected marine microalgae for the nursery production of bivalve seed. **Journal Shellfish Research**, v.6, p.71-77, 1987.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN C.Q. CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 79, n. 5, p. 707–18, 2008.

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. 8, p.2623–2628, 2010.

WANG, L.; LIU, J.; ZHAO, Q.; WEI, W.; SUN, Y. Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination systems **Bioresource Technology**, v.211, p.1-5, 2016.

WASIELESKY, W.; ATWOOD, H.; STOKES, A.; BROWDY, C. L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 258, p. 396-403, 2006.

WHYTE, J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalve. **Aquaculture**, v. 60, p.231-241,1987.

WU, L.F.; CHEN, P.C.; HUANG, A. P.; LEE, C, M. The feasibility of biodieselproduction by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 14-18, 2012.

YONESHIGUE-BRAGA, Y. Flora Marinha Bentônica da Baía de Guanabara e cercanias. III. Rhodophyta. 1. Goniotrichales, Bangiales, Compsopogonales, Nemalionales, Gelidiales. Publicação do Instituto de Pesquisas da Marinha, v. 55, p. 1-36, 1971.

YU, X.; ZHAO, P.; HE, C.; LI, J.; TANG, X.; ZHOU, J.; HUANG, Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. **Bioresource Biotechnology**, v. 121, p. 256-262, 2012.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de spirulina máxima.** Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: An innovative framework, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.

ZHU, L.; WANG, Z.; SHU, Q.; TAKALA, J.; HILTUNEN, E.; FENG, P.; YUAN, Z. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment **Water Research**, v. 47, p. 4294–4302, 2013.