

MARIANA FONSECA MACHADO

**CULTIVO DE MICROALGAS (*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. –  
CHLOROPHYCEAE) EM ÁGUA RESIDUÁRIA SUPLEMENTADA  
COM URÉIA E CO<sub>2</sub>**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título de  
Magister Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M149c  
2011 Machado, Mariana Fonseca, 1983-  
Cultivo de microalgas (*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp.  
- Chlorophyceae) em água residuária suplementada com  
uréia e CO<sub>2</sub> / Mariana Fonseca Machado. – Viçosa, MG,  
2011.  
ix, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Microalga - Cultivo. 2. *Chlorella*. 3. *Ankistrodesmus*.  
4. Biocombustíveis. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.83

MARIANA FONSECA MACHADO

**CULTIVO DE MICROALGAS (*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. –  
CHLOROPHYCEAE) EM ÁGUA RESIDUÁRIA SUPLEMENTADA  
COM URÉIA E CO<sub>2</sub>**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título de  
Magister Scientiae.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2011.

---

Prof. Eduardo Gusmão Pereira

---

Prof<sup>a</sup>. Jane Selia dos Reis Coimbra

---

Prof<sup>a</sup>. Rosane Maria de Aguiar Euclides  
(Orientador)

*D*edico este trabalho

**Aos meus pais, Geraldo e Maria Helena.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que se mostrou presente em toda minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis vividos durante o curso, me ajudando a superar os obstáculos que surgiram no caminho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Vegetal que ofereceram toda estrutura necessária para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

À Petrobrás pela cessão da água residuária utilizada no trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Rosane Aguiar, que me ensinou e ensina o quanto devemos amar aquilo que fazemos. O seu alto estral e otimismo são admiráveis. Obrigada pela orientação, paciência, ensinamentos e pelo carinho durante todo esse tempo de convivência.

Ao meu coorientador Prof. Márcio Arêdes Martins, que foi meu primeiro contato na UFV. Sou imensamente grata pela confiança, incentivo, apoio e disponibilidade que sempre me foram oferecidos. Assim como pelo fornecimento de materiais imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Nerilson Terra Santos pela orientação estatística sem a qual não seria possível a realização deste trabalho. Obrigada por toda paciência e atenção para comigo.

Ao amigo e companheiro de trabalho Jimmy Soares, que esteve presente nos momentos bons e ruins vividos durante o trabalho. Espero que nosso trabalho continue rendendo bons frutos.

Aos funcionários Rogério Gomide e João Bosco Soares pelo apoio técnico e pelas boas risadas que amenizavam o cansaço e alegravam o espírito.

Aos funcionários do programa de Fisiologia Vegetal, principalmente Antônio Teixeira Cordeiro e Carlos Raimundo Alves de Souza pelo auxílio em vários momentos de “sufoco”.

Ao Prof. Antônio Galvão do Nascimento e ao seu orientado Rafael Bastos, pelo auxílio e disponibilidade cedidos durante a desmontagem do experimento.

Ao colega Clenilson Sehnen Mota, por todo auxílio em vários momentos, principalmente na etapa final de elaboração de gráficos. Sua ajuda foi imprescindível, muito obrigada!

Ao Prof. Fábio M. daMatta, por permitir a utilização de equipamentos do seu laboratório, durante o período experimental e para realização de análises.

À Prof<sup>a</sup>. Jane Selia dos Reis Coimbra, que disponibilizou seu laboratório para a realização das análises necessárias para o trabalho.

Ao Ângelo Valentim Lopes, secretário da Botânica, por toda paciência e cordialidade. Pessoas como você são raras!

Aos colegas de laboratório Alberto Abrantes e Renan Rocha, por todo apoio e ajuda que me foram dados desde a minha chegada ao laboratório de Ficologia.

À Naiara Viana Campos, por toda ajuda tanto técnica quanto espiritual. Agradeço pelos ótimos momentos em que cultivamos uma boa amizade.

Ao Rafael Lira pelo apoio dado no início das análises realizadas.

Aos colegas da UCP, por todos bons momentos vividos durante o mestrado e por toda ajuda que me foi oferecida, em especial aos amigos da Ficologia.

Aos amigos da pós-graduação em Botânica que tive o prazer de conhecer e conviver.

À Prof<sup>a</sup>. Kacilda Naomi Kuki pelos os bons conselhos, pela companhia e boas risadas dados nestes dois anos.

Ao Prof. Diego Luiz Nunes, pelo apoio e incentivo dados desde a iniciação científica e pela amizade que cultivamos desde então. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar!

Ao Prof. Alex Nogueira Brasil e ao grupo ENERBIO, que foram os primeiros a me mostrar quão bela pode ser a pesquisa científica. Deixo aqui minha eterna gratidão.

À Dayana Maria Teodoro Francino, Josiene Rossini e Karina Zanoti, que me acolheram quando cheguei a Viçosa e que se tornaram minhas irmãs de coração.

Aos meus amigos divinopolitanos pela paciência durante esse período em que minha amizade não foi muito presente, obrigada por não desistirem de mim.

Ao meu querido Diego Ismael Rocha, que é meu amigo e meu amor. Sem seu apoio a caminhada até aqui seria mais dura e árdua. Obrigada por sempre estar ao meu lado e me compreender quando nem eu mesma fui capaz!

Aos meus pais Geraldo Eustáquio Rodrigues Machado e Maria Helena Fonseca Machado. Apesar da distância sempre me apoiaram em todos os momentos. Foram vocês que me deram novo fôlego a cada retorno a cidade de Viçosa. Obrigada por todo este amor e carinho para comigo. Amo vocês!

Aos meus irmãos e seus respectivos. Se me fosse dada a oportunidade de escolher minha família, vocês seriam os escolhidos. Amo cada um de vocês com todo meu coração. Obrigada pelo apoio e pelos ótimos momentos que passamos juntos.

Aos meus queridos e amados sobrinhos, João Vitor, Lucas, Luísa, Pedro e Isabella pela motivação de sempre buscar algo melhor.

## **BIOGRAFIA**

Mariana Fonseca Machado, filha de Geraldo Eustáquio Rodrigues Machado e Maria Helena Fonseca Machado, nasceu em 11 de agosto de 1983, na cidade de Divinópolis, Minas Gerais. Completou ensino médio em sua cidade de nascimento em 2001.

Fez curso de Licenciatura plena em Ciências Biológicas na Universidade de Itaúna, concluindo-o no ano de 2007.

Em 2009 iniciou o programa de mestrado em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, concluindo os requisitos para obtenção do título de Magister Scientiae em fevereiro de 2011.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	4
2. Revisão de Literatura.....	5
1.1. Microalgas e biodiesel.....	5
1.2. Sistemas de Cultivo de Microalgas .....	5
1.3. Condições de cultivo .....	6
1.4. Ecologia da Classe Chlorophyceae.....	8
1.4.1. Caracterização do gênero <b>Chlorella</b> .....	8
1.4.2. Caracterização do gênero <b>Ankistrodesmus</b> .....	9
1.5. Viabilidade e perspectivas .....	9
3. Referências Citadas .....	11
4. Material e Métodos.....	14
4.1. Obtenção dos micro-organismos .....	14
4.2. Isolamento e manutenção das cepas .....	14
4.3. Água de resíduo petroquímico.....	14
4.4. Meios de cultivos alternativos .....	15
4.5 Curvas de crescimento de cepas de microalgas.....	16
4.6. Cultivos em fotobiorreatores .....	17
4.7. Recuperação da biomassa algal produzida .....	17
4.8. Extração e quantificação de carboidratos .....	18
4.9. Extração e quantificação de proteínas .....	18
4.10. Extração e quantificação de lipídeos .....	18
4.11. Análise Estatística .....	19



5. Resultados.....	20
5.1. Cultivo de <i>Chlorella</i> sp. em ARP .....	20
5.1.1. Curvas de crescimento de <b>Chlorella</b> sp.....	20
5.1.2. Conteúdos celulares de <b>Chlorella</b> sp. ....	22
5.2. Cultivo de <i>Ankistrodesmus</i> sp. em ARP .....	26
5.2.1. Curvas de crescimento de <b>Ankistrodesmus</b> sp.....	26
5.2.2. Conteúdos celulares em <b>Ankistrodesmus</b> sp.....	28
6. Discussão.....	30
7. Conclusão .....	34
8. Referências Citadas .....	35

## RESUMO

MACHADO, Mariana Fonseca M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Cultivo de microalgas (*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. – *Chlorophyceae*) em água residuária suplementada com uréia e CO<sub>2</sub>.** Orientador: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Coorientadores: Márcio Arêdes Martins e Nerilson Terra Santos.

A utilização de água residuária como fonte de nutrientes para o crescimento de microalgas é uma medida sustentável que diminui o custo do cultivo e ameniza os impactos causados no meio ambiente. Este trabalho aborda o uso de água residual pré-tratada (ARP) provenientes de efluente produzido na Refinaria Gabriel Passos (unidade de refinaria da Petrobrás), no cultivo de microalgas nativas *Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp.. O cultivo foi realizado com diferentes doses de uréia em presença ou não de fluxos de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Os tratamentos foram ARP sem adição de uréia (ARP<sub>0</sub>), ARP com 75 mg (ARP<sub>1</sub>), ARP com 100 mg (ARP<sub>2</sub>) e ARP com 125 mg (ARP<sub>3</sub>), acrescidos de injeção de CO<sub>2</sub> no meio. O cultivo de *Chlorella* sp. teve duração de 18 dias e o de *Ankistrodesmus* sp. de 25 dias. Para cada tratamento foram obtidas curvas de crescimento, a partir de conteúdo de clorofila a. Foram realizadas análises dos conteúdos celulares: carboidratos totais, proteínas hidrossolúveis e lipídeos totais. Em *Chlorella* sp. o conteúdo de clorofila a foi maior no meio Watanabe (controle) (20 µg mL<sup>-1</sup>) do que nos meios alternativos. Foi observada maior produção de biomassa em meio ARP<sub>0</sub> comparando-se ao controle. *Chlorella* sp. demonstrou baixa produção de proteínas, tanto nos meios ARP quanto no meio Watanabe. A quantidade de lipídeos foi menor no meio ARP<sub>0</sub> do que no meio Watanabe, entretanto a produtividade lipídica apresentada, sem suplementação de CO<sub>2</sub>, no meio ARP<sub>0</sub> (41,08 mg L<sup>-1</sup>) foi maior do que a observada no controle (17,9 mg L<sup>-1</sup>). Em *Ankistrodesmus* sp., o maior conteúdo de clorofila a foi encontrado nos cultivos com o meio ARP<sub>2</sub>, apresentando 12 µg mL<sup>-1</sup>. Foi observado aumento no conteúdo protéico quando o cultivo de *Ankistrodesmus* sp. (nos meios ARP) foi realizado com maiores concentrações de uréia e na presença de CO<sub>2</sub>, apresentando 17,56 % de proteínas hidrossolúveis no meio ARP<sub>3</sub>. A porcentagem de lipídeos foi menor em ARP<sub>0</sub> do que em Watanabe. Os dados apresentados neste trabalho mostraram que a água residuária ARP apresentou-se eficaz para produção de biomassa de *Chlorella* sp., sendo observados valores maiores na produção de biomassa e na produtividade lipídica do que no meio Watanabe. *Ankistrodesmus* sp. obteve um crescimento significativo em ARP, porém esse crescimento foi equivalente ao crescimento em meio Watanabe. Entretanto, o teor de lipídeos foi menor, o que diminuiu a produtividade lipídica.

## ABSTRACT

MACHADO, Mariana Fonseca M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2011. **Cultivation of microalgae (*Chlorella* sp. and *Ankistrodesmus* sp. - Chlorophyceae) in wastewater supplemented with urea and CO<sub>2</sub>.** Advisor: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-Advisor: Márcio Arêdes Martins and Nerilson Terra Santos.

Wastewater has been used as feedstock nutrients for microalgae cultivation as a sustainable procedure, minimizing tillage costs and mitigating environment impacts. This work suggests the use of wastewater pre-processed (ARP) from the Refinery of Gabriel Passos (Betim-MG, as Petrobrás unit) as feedstock for the cultivation of native microalgae *Chlorella* sp. and *Ankistrodesmus* sp.. The growth was carried out with different amounts of urea in the absence and presence of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) efflux. The treatments were ARP without urea (ARP<sub>0</sub>), 75 mg ARP (ARP<sub>1</sub>), 100 mg ARP (ARP<sub>2</sub>) and 125 mg ARP (ARP<sub>3</sub>), added of CO<sub>2</sub>. The control system was the Watanabe synthetic medium. The cultivation of *Chlorella* sp. and *Ankistrodesmus* sp. lasted 18 and 25 days respectively. Growth curves were outlined for each treatment based on the chlorophyll a content (the parameter used for biomass production). The cellular contents were determined as total carbohydrate, hydrosoluble protein and total lipids. For the *Chlorella* sp., results showed that the bigger biomass content of chlorophyll a was found in the control system (20 µg mL<sup>-1</sup>). When urea was absence (ARP<sub>0</sub>), higher biomass content was obtained. *Chlorella* sp. synthesized lower protein production, in all treatments. The lipid percentage was lower in the ARP<sub>0</sub> than in the Watanabe medium. However, the lipidic productivity was higher in ARP<sub>0</sub> medium without CO<sub>2</sub> supplementation (41,08 mg L<sup>-1</sup>) than in the control system (17,9 mg L<sup>-1</sup>). For *Ankistrodesmus* sp., the higher chlorophyll a content (12 µg mL<sup>-1</sup>) was found in the ARP<sub>2</sub> system. It was observed a higher protein content when the cultivation was carried out with urea and CO<sub>2</sub>, reaching 17,56 % of hydrosoluble protein in ARP<sub>3</sub> medium (the same percentage found in the Watanabe control system). The lipid percentage was higher in the control system than in the ARP<sub>0</sub>. This research shows that the wastewater ARP seems to be an optional system for the production of *Chlorella* sp. biomass. It was observed a greater production of biomass and lipidic productivity in this medium than in Watanabe. The *Ankistrodesmus* sp. demonstrated a significant growth in Watanabe medium. However, the content of lipid was smaller, hence decreasing the lipidic productivity.

## 1. Introdução

O crescimento econômico, juntamente com o aumento populacional, culmina em maior demanda de energia global. O setor de transporte é um dos que mais crescem, utilizando 27% da energia primária mundial (Antoni et al., 2007). O uso de biocombustíveis desempenha um importante papel garantindo a segurança de abastecimento, minimizando a vulnerabilidade deste setor, além de reduzir a utilização de derivados do petróleo (Mutanda et al., 2011; Gouveia e Oliveira, 2009; Singh et al., 2011b). Assim, existe uma demanda por fontes energéticas que não concorram com a produção de alimentos (Singh et al., 2011a) e que sejam ambientalmente sustentáveis.

As microalgas são, notadamente, reconhecidas como fonte energética alternativa e promissora para produção de biocombustível, quando comparadas com outras culturas energéticas tradicionais (Schenk et al., 2008, Mata et al., 2010). Sua eficiência fotossintética acoplada a um rápido crescimento (tempo de geração) e produção de biomassa em curto intervalo de tempo (Feng et al., 2011), tornam-as modelos práticos para serem utilizadas na produção de biocombustíveis tais como o etanol (Shirai et al., 1998), biohidrogênio (Hemschemeier et al., 2009; Schenk et al., 2008), e o biodiesel (Chisti, 2007; Li et al., 2008a; Mata et al., 2010).

O cultivo de microalgas, em grande escala, tem recebido atenção especial dadas as suas características potenciais: ciclos de vida curtos, cultivo em água doce, salgada, salobra e águas residuais, uso de terras não cultiváveis, e o fato de não demandarem grandes áreas de produção (Chisti, 2007; Gouveia e Oliveira, 2009; Bhatnagar et al., 2010). Além disso, as microalgas podem atuar eficientemente no mecanismo de sequestro de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera, contribuindo para a redução do efeito estufa, minimizando os problemas associados à poluição atmosférica (Wang et al., 2008).

Entretanto, existem desafios técnicos associados ao cultivo de microalgas quando esse adquire o âmbito industrial. Os processos disponíveis para recuperação de biomassa final, tais como: centrifugação, filtração e floculação são, ainda, insatisfatórios (Pittman et al., 2011), visto que os métodos de alta eficiência são, geralmente, mais dispendiosos. Igualmente, os meios de cultivo para microalgas, convencionais, apresentam elevados custos (meios artificiais contendo os macro e micronutrientes sintéticos). Todas essas questões são polêmicas, principalmente quando associadas a questão do uso de grandes volumes de água potável que serão empregadas na produção, em larga escala (Yang et al., 2011).

Uma seleção prévia de cepas de microalgas com elevada taxa de crescimento e produção de biomassa é essencial para o cultivo em escala industrial, uma vez que a alta produtividade de biomassa aumenta o rendimento por unidade de volume de recuperação, diminui o custo de produção e reduz o risco de contaminação devido à presença/competição com outros microorganismos (Griffiths e Harrison, 2009). Dentre as microalgas mais utilizadas para produção de biomassa destacam-se os organismos da Classe Chlorophyceae, os quais apresentam diversos membros com altas taxas de divisão celular (tempo de geração curto). Alguns representantes das famílias Oocystaceae (*Chlorella* sp.) e Selenastraceae (*Ankistrodesmus* sp.) são exemplos típicos de microalgas, unicelulares, com ampla distribuição geográfica e que geram elevadas quantidades de biomassa em curtos intervalos de tempo (Sipaúba-Tavares et al., 2009; Mohan et al., 2009).

Para que os biocombustíveis, produzidos a partir da biomassa de microalgas, sejam economicamente viáveis, têm sido propostos por diferentes autores que o cultivo seja realizado de forma alternativa, sem a utilização dos meios sintéticos convencionais (Joseph e Joseph, 2001; Bhatnagar et al., 2010; Chinnasamy et al., 2010). O uso de águas de efluentes industriais, agrícolas e águas de esgotos domésticos têm sido indicados como meios alternativos, capazes de diminuir o valor agregado dos cultivos (Pittman et al., 2011), visto que tais resíduos, geralmente, são liberados no meio ambiente sem tratamento prévio. Processos biotecnológicos, como o cultivo de microalgas, além de fornecer bioenergia, podem também reduzir o custo do tratamento de águas residuais (Chinnasamy et al., 2010).

A capacidade das microalgas para remediar efluentes industriais tem sido apontada como sendo promissora (Joseph e Joseph, 2001). Concentrações de nutrientes essenciais para o cultivo de microalgas são normalmente identificados, em elevadas quantidades, nessas águas, dentre os quais estão incluídos o nitrogênio (N) e o fósforo (P) (Pittman et al., 2011). Chinnasamy et al. (2010) observaram o crescimento de microalgas dos Phyla Chlorophyta (27 espécies), Cyanophyta (20 espécies) e Bacillariophyta (8 espécies) cultivadas em efluentes de uma indústria de carpetes situada em Dalton, no estado da Geórgia (Estados Unidos), contendo cerca de 85-90 % de água de resíduo industrial e o restante composto por um típico esgoto sanitário da região. Algumas espécies (*Botryococcus braunii*, *Chlorella saccharophila*, *Dunaliella tertiolecta* e *Pleurochrysis carterae*) apresentaram melhor produção de biomassa quando cultivadas em água residuária do que no controle (meio convencional BG 11).

Segundo Bhatnagar et al. (2010), em efluentes de esgotos domésticos, *Chlorella minutissima* mostrou ser tolerante à ausência de oxigênio (O<sub>2</sub>) dissolvido, crescendo em faixas variadas de pH (4-12) e diferentes intensidades luminosas (2  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$  a 30  $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). No entanto, nem todas as microalgas avaliadas conseguiram crescer em águas residuárias municipais. Deve-se considerar que, na entrada de um sistema de tratamento, a água geralmente apresenta excessos de nutrientes tais como sais dissolvidos e substâncias tóxicas, baixas concentrações de oxigênio, e ocorre pouca penetração de luz. A vantagem deste tipo de habitat é oferecer baixa competição, facilitando uma melhor adaptação das microalgas às condições existentes e, conseqüentemente, favorecendo o aumento da taxa de crescimento, ou seja, da produção de biomassa nas espécies estudadas.

O suprimento de minerais nos meios de cultivo, pode exercer grande influência na composição bioquímica dos conteúdos celulares microalgais, pelo menos em determinadas espécies. Por exemplo, em *Chlorella vulgaris* o aumento nas concentrações de ferro (Fe<sup>+3</sup>), no meio de cultivo, proporcionou elevação na taxa de crescimento celular, bem como, no conteúdo lipídico, quando os organismos foram comparados aos tratamentos onde as concentrações de Fe<sup>+3</sup> foram mantidas idênticas ao meio sintético padrão (Liu et al., 2008). Os experimentos também mostraram que, o suprimento de nitrogênio (N) quando presente no meio em concentrações elevadas permite maior produção de proteínas, mas reduz o conteúdo de lipídeos. Porém, quando as concentrações de N são reduzidas, o resultado foi o inverso, seguido por uma taxa reduzida de divisão celular (Illman et al., 2000; Li et al., 2008b). Em *Ankistrodesmus falcatus*, o fornecimento de fósforo (P) no meio de cultura, resultou em importante aumento do metabolismo de lipídeos e de proteínas. A limitação de P, entretanto, acarretou a diminuição do conteúdo protéico e o aumento do conteúdo lipídico (Kilham et al., 1997).

A seleção prévia de cepas de microalgas, com taxas de crescimento elevadas, é essencial e esperada para o cultivo em escala industrial, visto que uma densidade alta de biomassa aumenta o rendimento do cultivo por unidade de volume de recuperação, diminuindo os custos, além de reduzir os riscos de contaminação devido à competição com outros microorganismos (Griffiths & Harrison, 2009).

A Classe Chlorophyceae apresenta diversos representantes, com potencial para produzir altas taxas de crescimento (divisão celular). Micro-organismos como *Chlorella* sp. (Oocystaceae) e *Ankistrodesmus* sp. (Selenastraceae), são unicelulares, de águas continentais, com ampla distribuição geográfica e capazes de gerar elevada quantidade de biomassa sob determinadas condições de cultivo (Sipaúba-Tavares et al., 2009; Mohan et al., 2009).

## **1.1. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivos:

1. Determinar o potencial da água residuária da indústria petroquímica como meio alternativo para crescimento de *Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp;
2. Avaliar a taxa de crescimento das cepas em água residuária suplementada com CO<sub>2</sub> e uréia (fonte de nitrogênio);
3. Quantificar os conteúdos bioquímicos celulares: proteínas totais, carboidratos totais e lipídios totais em diferentes condições de cultivo;
4. Otimizar a produção de lipídeos totais nos conteúdos celulares das cepas selecionadas a partir da limitação de nitrogênio no meio (uréia).

## **2. Revisão de Literatura**

### **1.1. Microalgas e biodiesel**

As pesquisas na área de combustíveis alternativos têm aumentado nos últimos anos. Tal fato se dá pela busca de medidas que amenizem a quantidade de poluentes lançados na atmosfera, os chamados gases de efeito estufa (GEE), gerados pela utilização de produtos provenientes do petróleo (Li et al., 2008a). Elevadas concentrações de GEE intensificam o aquecimento global que hoje é uma preocupação crescente tanto no quesito meio ambiente como saúde pública (Gunter et al., 1998).

O biodiesel tem se mostrado promissor por apresentar características físico-químicas semelhantes as do diesel, o que facilita sua mistura ou mesmo substituição ao combustível de petróleo (Bueno, 2006). Além disso, é considerado menos poluente que os combustíveis fósseis, não emitindo enxofre para a atmosfera (Parente, 2003), gerando créditos de carbono, segundo mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL) (Pian et al., 2009).

Para a produção desse bicomcombustível são empregadas diversas fontes oleaginosas, dentre elas soja, algodão, canola, pinhão manso, girassol, macaúba e dendê (Melo, 2007; Quintella et al., 2009) que são tidas como potenciais pela elevada produção de óleo. Essas matérias-primas demandam grandes áreas de cultivo, além de aumentarem os preços dos alimentos, como é o caso das culturas alimentares (Quintella et al., 2009).

Como alternativa a culturas oleaginosas convencionais, as microalgas têm sido apontadas como fonte de matéria prima promissora para o fornecimento de óleo destinado a produção de biodiesel (Hossain et al., 2008). São organismos autotróficos, que utilizam energia luminosa para seu crescimento, possuem elevadas taxas de crescimento com curtos ciclos de vida, o que confere a elas elevada geração de biomassa em curto intervalo de tempo e podem ser cultivadas em água doce, salgada, salobra e águas residuárias (Chisti, 2007; Patil et al., 2008).

### **1.2. Sistemas de Cultivo de Microalgas**

Os cultivos em grande escala utilizados para produção comercial de biomassa algal, têm sido realizados em lagoas abertas e em fotobiorreatores fechados. Estes sistemas podem ser instalados ao ar livre ou em ambiente fechado. Em locais abertos, a energia luminosa utilizada, geralmente, é a luz solar. Nos ambientes fechados, existem duas



possibilidades: a utilização de energia solar quando o cultivo é realizado em estufas e o uso de iluminação artificial (Lourenço, 2006).

O cultivo em lagoas abertas é muito utilizado em grande escala devido ao seu baixo custo, simplicidade de manuseio e manutenção. Todavia, o controle sobre as variáveis abióticas no cultivo aberto é reduzido (Stephenson et al., 2010; Ugwu et al., 2008). A densidade celular, nesse tipo de sistema, é menor do que no cultivo fechado, visto que em altas concentrações celulares, a luz é impedida de penetrar no meio, causando auto sombreamento (Brennan et al., 2010; Melo, 2008). Além disso, a utilização do dióxido de carbono é muito menos eficiente do que em sistemas fechados por causa de significantes perdas para a atmosfera (Chisti, 2007).

Os fotobiorreatores são aparatos que podem ser usados para geração de biomassa visando obter produtos de elevado valor aquisitivo com demanda na indústria alimentícia e farmacêutica (Olaizola, 2003). A utilização de fotobiorreatores para cultivo de microalgas possui vantagens como a possibilidade de obtenção de elevada densidade celular, devido a maior superfície iluminada, o menor risco de contaminação e o controle de variáveis como temperatura e a injeção de CO<sub>2</sub>. Contudo, esta tecnologia possui custo elevado sendo de difícil manuseio e demandando mão de obra especializada (Ugwu et al., 2008; Li, 2008b).

### 1.3. Condições de cultivo

As condições de cultivo de microalgas são essenciais para moldar o perfil de crescimento de cada organismo. Diferentes meios de cultivo, por exemplo, podem interferir na composição bioquímica da microalga e alterar sua taxa de crescimento (Illman et al., 2000; Coverti et al., 2009; Liu et al., 2008). Fatores abiótico como concentração de nutrientes, intensidade luminosa, pH, temperatura, dentre outros, podem mudar rotas metabólicas desses micro-organismos (Beardall et al., 2001; Hu et al., 2008). De fato, esta é uma ferramenta que pode ser utilizada nos cultivos para geração de compostos de interesse.

A composição bioquímica das microalgas está relacionada à integração de vários processos envolvidos na absorção e assimilação de nutrientes. Por exemplo, a deficiência de certos nutrientes poderá levar a uma maior absorção do mesmo no meio (Beardall et al., 2001).

Quando o meio possui limitação de nitrogênio (N), algumas microalgas reagem com aumento nos teores de lipídeos ou carboidratos, havendo um decréscimo na síntese de

proteínas (Illman et al., 2000; Richmond, 2004). A rota de produção de proteínas, neste caso, é desviada para produção dos outros dois componentes celulares. A célula responde a deficiência como um período de escassez do nutriente e direciona o metabolismo para acúmulo de material de reserva (Grobbelaar, 2004).

O teor de fósforo (P) disponível para as microalgas também pode provocar diferentes respostas na produção de componentes celulares. Em *Ankistrodesmus falcatus* a limitação deste nutriente aumentou a produção de lipídeos e carboidratos e diminuiu a síntese de proteínas, segundo Kilham et al. (1997).

Micronutrientes também são requeridos, em concentrações baixas, e quando em excesso podem ser tóxicos no meio de cultura. Por exemplo, o molibdênio (Mo) é necessário para a assimilação do nitrogênio. O cobalto (Co) é requerido nas microalgas que sintetizam vitamina B<sub>12</sub>. Aquelas que não sintetizam a vitamina B<sub>12</sub> não requerem o Co, mas sim a própria vitamina, sendo necessário, por vezes, também adicionar outras vitaminas, tais como a tiamina e a biotina (Soares, 2000; Lourenço, 2006). O excesso de ferro (Fe) no meio de cultura tem sido relatado como responsável por aumentar consideravelmente os teores lipídicos de *Chlorella vulgaris* (Liu et al., 2008), pois o Fe é imprescindível para o metabolismo do N, da fotossíntese e da síntese de citocromos (Soares, 2000).

A intensidade luminosa pode ser um fator limitante no crescimento das microalgas, sendo que existe uma faixa ótima de iluminação para maior geração de biomassa (Richmond, 2004). O aumento da intensidade luminosa em *Chlorella vulgaris* (de 25  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para 60  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), estimulou uma maior geração de biomassa. No entanto, a duplicação dessa última intensidade luminosa (120  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) causou diminuição da produção de biomassa (Lv et al., 2010). Este fato é atribuído a fotoinibição, devido ao processo de auto sombreamento gerado no meio por causa da elevada densidade celular.

A temperatura pode influenciar de forma significativa o cultivo, sendo que cada espécie exibe um perfil de crescimento dentro de uma determinada faixa de temperatura. No cultivo de *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* foram utilizadas, por Converti et al. (2009), diferentes temperaturas para observar a geração de biomassa e o conteúdo de lipídeos totais. *Chlorella vulgaris* demonstrou melhor produtividade tanto de biomassa quanto lipídica quando cultivada nas temperaturas entre 25 e 30 °C. Quando o cultivo foi realizado em temperaturas mais elevadas (acima de 35 °C) houve a diminuição do crescimento, ou até mesmo, a morte celular. *Nannochloropsis oculata* respondeu bem a temperatura de 20 °C em relação à produtividade lipídica, visto que em temperaturas

menores (15 °C) foram obtidos valores reduzidos de produtividade lipídica e em maiores (25 °C) a produtividade permaneceu constante (Converti et al., 2009).

O controle do pH é essencial para que os nutrientes do meio de cultura possam ser efetivamente absorvidos, uma vez que afetam diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos (Lourenço, 2006). O perfil de conteúdos celulares também pode ser alterado em diferentes valores de pH. *Chlorella ellipsoidea* e *Dunaliella bardawil* apresentaram diferentes teores de proteínas, carboidratos e lipídeos e conteúdo de biomassa em diferentes faixas de pH (Khalil et al, 2010).

#### 1.4. Ecologia da Classe Chlorophyceae

Alguns representantes da Classe Chlorophyceae, como os gêneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus* e *Dunaliella* têm sido relatados na literatura por sua elevada produção de biomassa (Kong et al., 2010; Chisti, 2007; Mata et al., 2010).

Organismos dessa Classe são predominantemente de água doce, possuem clorofila a e b, e formam o material de reserva (amido) dentro dos cloroplastos, sendo caracterizados por apresentarem a quebra da uréia por meio da enzima uréia amidolase, ao contrário do que acontece em outras Classes nas quais a enzima que realiza a quebra da uréia é a urease. O cloroplasto apresenta duas membranas e seus representantes podem possuir motilidade ou não (Lee, 2008; Shubert, 2003).

##### 1.4.1. Caracterização do gênero **Chlorella**

Apresenta distribuição cosmopolita. São organismos representantes do fitoplâncton de lagos e lagoas, também ocorrem em solos e em grande parte dos substratos subaéreos, ou ainda em endossimbiose com protozoários ciliados (*Hydra*, *Spongilla*) (Shubert, 2003; Qiao et al., 2009).

As células de *Chlorella* podem ter de 2 a 12 µm de diâmetro, são unicelulares esféricas, ovoides ou elipsoidais, podendo ocorrer em água doce, salgada e solos. O cloroplasto é parietal, em forma de “taça”, podendo apresentar ou não um pirenoide (Graham e Wilcox, 2000; Shubert, 2003).

A reprodução é principalmente assexuada sendo realizada pela formação de quatro autoesporos. A reprodução sexuada é desconhecida (Graham e Wilcox, 2000).

#### 1.4.2. Caracterização do gênero **Ankistrodesmus**

O gênero faz parte do fitoplancton de lagos e lagoas, e do metafíton de valas d'água, lagos e lagoas. É um dos gêneros de algas cocóides mais comuns entre as algas verdes (Shubert, 2003).

As células são solitárias (unicelulares) ou frouxamente agrupadas em feixes (podendo apresentar-se retorcidas umas sobre as outras), em tufo ou misturadas com outras algas; não possuem envelope mucilaginoso. Possuem forma alongada, ou estreitamente afilada nas extremidades. A célula apresenta-se, geralmente, em forma curvada, podendo ser reta (Shubert, 2003). O cloroplasto é parietal podendo apresentar ou não pirenoide.

A reprodução assexuada ocorre por clivagem da célula parietal em 1-16 autoesporos que são liberados pela ruptura da parede celular da célula parietal. Estágio flagelar ou reprodução sexuada são desconhecidos (Graham e Wilcox, 2000).

#### 1.5. Viabilidade e perspectivas

A seleção de espécies potenciais para produção de matéria-prima para biodiesel deve levar em conta fatores como a capacidade da microalga crescer usando os nutrientes disponíveis no meio ou, a capacidade de adaptar-se às condições ambientais específicas. Estes parâmetros devem ser considerados, simultaneamente, na seleção das espécies mais adequadas para a produção de biodiesel.

Muitos pesquisadores tem observado as respostas fisiológicas das microalgas em condições de estresse. O perfil lipídico pode ser moldado a partir de aspectos ecofisiológicos, como temperatura de cultivo e deficiências nutricionais (Hu et al., 2008; Illman et al., 2000; Converti et al., 2009). Certamente, esse é um dos caminhos para aumentar a produtividade lipídica em microalgas, tornando o seu cultivo economicamente viável.

Selecionar organismos tolerantes e/ou resistentes sob condições adversas, pode ser um fator determinante para a obtenção de biomassa, incluindo cepas com tolerância a turbulência intensa em fotobiorreatores (Brennan et al., 2010) e a alta salinidade (Hiremath e Mathad, 2010).

A viabilidade do cultivo depende de medidas sustentáveis. Ao invés da utilização de meios de cultivos sintéticos, que tem valor aquisitivo elevado, deve-se optar pela reutilização de águas de resíduo agrícola e industrial (Bertoldi et al., 2008; Hodaifa et al.,

2008; Bhatnagar et al., 2011, in press). Quanto a fonte de carbono, a utilização de CO<sub>2</sub> provindo de exaustão de gases de indústrias é uma opção eficaz e de baixo custo (Liu e Shao, 2010). Tais medidas diminuem o custo de produção além de gerarem créditos de carbono segundo mecanismos de desenvolvimento limpo (Pian et al., 2009).

### 3. Referências Citadas

- Beardall, J., Young, E. e Roberts, S. (2001) Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences*, 63:44–69. doi: 1015-1621/01/010044-26 \$ 1.50+0.20/0.
- Bertoldi, F. C.; Sant’Anna, E.; Oliveira, J. L. B. (2008) Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. *Ciência Rural*, 3:54–58.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S. e Singh, M. e Das, K.C. (2011) Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, (In Press).
- Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae — A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.
- Bueno, A.V. (2006) Análise da operação de motores diesel com misturas parciais de biodiesel. Tese de Doutorado. UNICAMP, Campinas, SP. 120 p.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Converti, A.; Casazza, A. A.; Ortiz, E. Y.; Perego, P. e Borghi, M. D. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48:1146–1151.
- Graham, L.E. e Wilcox, L.W. (2000) *Algae*. Prentice Hall. Upper Saddle River , New Jersey, USA.
- Grobbelaar, J.U. (2004) Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science.
- Gunter, W. D.; Wong, S.; Cheel, D. B.; Sjostrom, G. (1998) Large CO<sub>2</sub> sinks: Their role in the mitigation of greenhouse gases from an international, national (Canadian) and provincial (Alberta) perspective. *Applied Energy*, 61:209–227.
- Hiremath, S. e Mathad, P. (2010) Impact of Salinity on the Physiological and Biochemical Traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1:51-59.
- Hodaifa, G.; Martinez, M. E, e Sánchez, S. (2008) Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 99:1111–1117. doi:10.1016/j.biortech.2007.02.020.
- Hossain, A. B. M. S.; Salleh, A.; Boyce, A. N.; Chowdhury, P. e Naquiuddin, M. (2008) Biodiesel fuel production from algae as renewable energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4:250-254.

- Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M. e Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54:621–63.
- Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27:631–635.
- Khalil, Z.I., Asker, M.M.S., El-Sayed, S. e Kobbia, I.A. (2010) Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1225–1231. doi:10.1007/s11274-009-0292-z.
- Kilham, S., Kreeger, D.A., Goulden, C.E., Lynn, S.G. (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38: 591-596.
- Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P. e Ruan, R. (2010) Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 160:9–18. doi:10.1007/s12010-009-8670-4.
- Lee, R.E. (2008) *Phycology*. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Li, Q., Du, W. e Li, D. (2008a) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80:749–756.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008b) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:629–636. doi:10.1007/s00253-008-1681-1.
- Liu, H. e Shao, Y. (2010) Predictions of the impurities in the CO<sub>2</sub> stream of an oxy-coal combustion plant. *Applied Energy* 87:3162–3170. doi:10.1016/j.apenergy.2010.04.014.
- Liu, Z.Y., Wang, G., Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99:4717–4722. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.073.
- Lourenço, S.O. (2006) *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. Rima, São Carlos.
- Lv, J.M, Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L (2010) Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* 101:6797–6804. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.120.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Melo, J. C. de. (2007) *Otimização da Produção de Biodiesel*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 95p.

- Melo, R. de S. (2008) Avaliação da utilização de exopolissacarídeos de cianobactérias como fonte de inibidores na formação do biofilme bacteriano. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 106 p.
- Olaizola, M. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20:459-466. doi:10.1016/S1389-0344(03)00076-5.
- Parente, E. J. de S. (2003) Biodiesel: Uma Aventura Tecnológica num País Engraçado. Tecbio. Fortaleza, CE.
- Patil, V., Tran, K.Q. e Giselrød, H.R. (2008) Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 9:1188-1195. doi:10.3390/ijms9071188.
- Pian, L. B.; Schirmer, N. W.; Balbinot, R. e Danczuk, M. (2009) Determinação da linha de base e adicionalidade de um projeto de MDL a partir da emissão de poluentes utilizando diferentes combustíveis. *Estudos Tecnológicos*. v.5, n.3: 270-283.
- Qiao, H., Wang, G. e Zhang, X. (2009) Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth1. *Journal of Phycology*, 45:1153–1162. doi:10.1111/j.1529-8817.2009.00736.x.
- Quintella, C.M., Teixeira, L.S.G, Korn, M.G.A., Neto, P.R.C, Torres, E.A., Castro, M.P., Jesus, C.A.C. (2009) Cadeia do biodiesel da bancada à indústria: uma visão geral com prospecção de tarefas e oportunidades para P&D&I. *Quimica Nova* 32:793-808.
- Richmond, A. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing.
- Shubert, L.E. (2003) Nonmotile coccoid and colonial green algae. In: Wehr, J.D. e Sheath, R.G. (eds.). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Academic Press.
- Soares, R. de J.B. (2000) Avaliação das possibilidades de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas. Dissertação de mestrado. Universidade do Porto, Porto. 152 p.
- Stephenson, A.L., Kazamia, E., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott e Smith, A.G. (2010) Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the United Kingdom: a comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. *Energy Fuels*, 24:4062-4077. doi:10.1021/ef1003123.
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99:4021–4028. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.046.



## 4. Material e Métodos

### 4.1. Obtenção dos micro-organismos

As amostras de água foram coletadas em diferentes lagoas artificiais do município de Viçosa – MG, e também da Universidade Federal de Viçosa (UFV), utilizando-se rede de fitoplâncton (abertura de malha = 20 µm), em arrastes verticais e horizontais, sendo as mesmas acondicionadas em frascos vítreos com tampas herméticas.

As amostras foram transportadas para o Laboratório de Ficologia, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), do Departamento de Biologia Vegetal – UFV, onde foram enriquecidas com o meio de cultura Watanabe (Watanabe, 1960).

### 4.2. Isolamento e manutenção das cepas

O isolamento de cepas foi realizado aplicando-se os métodos de micropipetagem e diluição (Aguiar, 2000), cuja finalidade é de obter culturas monoespecíficas de *Chlorella* sp., e *Ankistrodesmus* sp..

Os gêneros foram identificadas de acordo com a chave de identificação de Bicudo et al. (2006), Shubert (2003) e Huber-Pestalozzi (1983).

As culturas monoalgais (não axênicas) foram mantidas em sala de cultivo, sob condições fotoautotróficas de crescimento, ou seja, sob temperatura de  $(27 \pm 2)$  °C, fotoperíodo de 16/8 h de luz/escuro, irradiância média de 66 µmols fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provenientes de lâmpadas fluorescentes (40 W), e aeração constante, visando obtenção de inóculo para os experimentos posteriores.

### 4.3. Água de resíduo petroquímico

Foi utilizada água residual (água de resíduo petroquímico - ARP), pré-tratada, obtida diretamente da refinaria Gabriel Passos, unidade de refinamento de petróleo da Petrobrás, localizada no município de Betim, Minas Gerais, cuja composição química está descrita na tabela abaixo.

Tabela 1 – Caracterização físico-química da água residuária proveniente de efluente pré-tratado da Refinaria Gabriel Passos (Petrobrás), Betim/MG.

Nutriente	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )
Cálcio	724
Magnésio	273
Sódio	2.869
Potássio	642
Estrôncio	21,7
Bário	1,06
Amônia	3,75
Bicarbonato	1.482
Sulfato	1.265
Cloreto	5.291
Fluoreto	4,81
Nitrato	51,1
Fosfato	3,16
Sílica	29

Variáveis	Valor
pH	8,14
TDS (*)	12.660 mg L <sup>-1</sup>
Condutividade	17.728 $\mu$ S cm <sup>-1</sup>

\*Sólidos totais dissolvidos

No laboratório, a água foi estocada em câmara fria a temperatura de  $5 \pm 2$  °C, com a finalidade de atenuar a atividade metabólica, ou seja, reduzir o crescimento microbiano.

#### 4.4. Meios de cultivos alternativos

Os cultivos foram realizados em meio de cultura Watanabe (controle) (Watanabe, 1960) (Tabela 2) e em ARP (tratamento) (Tabela 1), suplementado com solução A<sub>5</sub> contendo micronutrientes (1 mL L<sup>-1</sup>), FeSO<sub>4</sub> (20 mg L<sup>-1</sup>) e uréia. A adição de uréia foi baseada no melhor tratamento obtido por Hsieh et al. (2009), equivalente a 100 mg L<sup>-1</sup> de uréia. Em todas as unidades experimentais a concentração de nutrientes, exceto uréia, foi mantida constante.

Tabela 2 – Composição do meio de cultura Watanabe (controle) (Watanabe, 1960)

Nutriente	Concentração	Unidade
KNO <sub>3</sub>	1,25	g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	20	mg L <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub>	20	mg L <sup>-1</sup>
Solução A5	01	mL

**\* Solução A5**

Nutriente	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub> O	2,9
MnCl <sub>2</sub>	1,81
CuSO <sub>4</sub>	0,08
3(NH <sub>4</sub> )O.7MoO <sub>3</sub>	0,018
ZnCl <sub>2</sub>	0,11

Cinco tratamentos foram realizados: Watanabe (controle), ARP<sub>0</sub> (0 mg de uréia), ARP<sub>1</sub> (75 mg de uréia), ARP<sub>2</sub> (100 mg de uréia) e ARP<sub>3</sub> (125 mg de uréia). Todos os meios de cultivo tiveram o pH ajustados para 6,5, e posteriormente, foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos.

Para cada meio de cultura (Controle, ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>) foi realizada a suplementação ou não com de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), com a finalidade de avaliar as alterações causadas no crescimento das microalgas em função da disponibilidade deste gás no meio, vinte unidades experimentais dos cinco tratamentos foram suplementadas com CO<sub>2</sub> proveniente de fermentação biológica, oriundo de um reator, o qual abasteceu os fotobiorreatores. Cada tratamento foi realizado com quatro repetições, gerando 40 unidades experimentais.

#### 4.5 Curvas de crescimento de cepas de microalgas

As curvas de crescimento foram geradas em experimentos conduzidos em triplicatas, para os quatro meios de cultivos alternativos propostos mais o meio Watanabe. O cultivo foi realizados em frascos de 50 mL em shaker com rotação de (100 ± 5) rpm. O crescimento das cepas foi monitorado pela concentração de clorofila a (variável utilizada para avaliar a biomassa produzida), em dias alternados, sendo o primeiro dia considerado o ponto zero. A análise do crescimento teve duração de 20 dias, gerando uma curva com dez pontos discriminados.

A extração de clorofila a foi realizada utilizando-se alíquotas de 1,0 mL de cultura, em tubos de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, e o sobrenadante descartado. Logo após, foi acrescentado 1,0 mL de água deionizada ao “pellet” que foi homogenizado em vortex. Foram adicionados 4,0 mL de metanol P.A., sendo as amostras levadas ao banho termostático em temperatura de 65 °C, por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas (3.000 rpm) e o sobrenadante teve sua absorbância lida em espectrofotômetro (UVmini-1240, Shimadzu), nos comprimentos de onda de 653 nm e 666 nm, respectivamente. Posteriormente, a concentração de clorofila **a** foi calculada a partir da equação abaixo, descrita de acordo com a metodologia de Dere et al. (1998):

$$C = (15,65 A_{666} - 7,340 A_{653}) 5, \text{ em que,} \quad (1)$$

C: concentração de clorofila a ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

A: Absorbância

As curvas de crescimento para as cepas estudadas foram representadas em gráficos, com o auxílio do software OriginPro 8.

#### 4.6. Cultivos em fotobiorreatores

Os cultivos foram conduzidos em fotobiorreatores, utilizando-se Erlenmeyers de 2,0 L, com volume útil de 1,8 L. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo, sob condições fotoautotróficas de crescimento e intensidade luminosa  $66 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Nos fotobiorreatores foram adicionados 10% (v/v) de in\u00f3culo de microalgas aos meios de cultura (Watanabe, ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>).

Os experimentos de cultivo com *Chlorella* sp. tiveram dura\u00e7\u00e3o de 18 dias (tempo de gera\u00e7\u00e3o – 17 h), enquanto os cultivos com *Ankistrodesmus* sp. tiveram dura\u00e7\u00e3o de 25 dias (tempo de gera\u00e7\u00e3o – 97 h).

#### 4.7. Recupera\u00e7\u00e3o da biomassa algal produzida

Ap\u00f3s o t\u00e9rmino dos experimentos, a biomassa algal foi centrifugada a 8.000 rpm, durante 10 minutos, para separa\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas do meio de cultivo. O “pellet” obtido foi estocado em freezer (-80 °C), durante 24 horas. Posteriormente, a biomassa foi liofilizada (Liofilizador LS 3.000, Terronni). Ap\u00f3s o processo de liofiliza\u00e7\u00e3o, o material foi mantido em refrigerador at\u00e9 a realiza\u00e7\u00e3o das an\u00e1lises de carboidratos totais, prote\u00ednas hidrossol\u00faveis e lip\u00eddeos totais.

#### 4.8. Extração e quantificação de carboidratos

A determinação de carboidratos totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Korchert (1978) apud Derner, 2006. Foram pesados 5 mg de biomassa liofilizada, a qual foi submetida a hidrólise alcalina com 2 mL de NaOH 1,0 N a 95 °C em banho termostático por uma hora. Após alcançar a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos. Realizada a extração, 100 µL do extrato alcalino obtido foram transferidos para um tubo de ensaio, adicionando-se em seguida 1,0 mL de NaOH 1,0 N e 500 µL de fenol a 5 %. Os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, foram adicionados 5,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. A leitura da absorbância em espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 485 nm. A curva padrão foi obtida a partir de uma solução padrão de glicose na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.9. Extração e quantificação de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976). Foram pesados 5 mg de biomassa liofilizada, a qual foi submetida a hidrólise alcalina com 800 µL de NaOH 0,1 M a 95 °C em banho-maria por 30 minutos. Logo após, a amostra foi resfriada em gelo e neutralizada com 200 µL de HCl 0,4 M (Meijer e Wijffels, 1998). A quantificação das proteínas celulares foi feita utilizando-se o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford, 1976). As reações entre o reagente de Bradford e a amostra ocorreram à temperatura ambiente durante 5 minutos. As leituras foram feitas em Leitor Elisa (Asys – UVM 340) a 595 nm. A curva de calibração foi gerada a partir de uma solução de 1µg/µL de BSA (Albumina do Soro Bovino).

#### 4.10. Extração e quantificação de lipídeos

Para a quantificação de lipídeos totais foi realizada uma metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959), mediada por ultrassom. O método foi realizado usando-se 100 mg de biomassa seca e, como solvente, uma mistura de clorofórmio, metanol e água (1:1:0,9 v/v). O material foi levado ao vortex por 2 minutos e em banho ultrassônico (Thornton Gerador GA900 Imper Eletrônica), por 30 minutos. A mistura foi filtrada para remoção das partículas de biomassa em suspensão e a fração lipídica foi recuperada do filtrado após evaporação do solvente em banho-maria dentro de capela de exaustão de gases, sendo os lipídeos quantificados por diferença de massas (Ranjan et al., 2010).

#### 4.11. Análise Estatística

O experimento foi realizado em fatorial. As médias dos conteúdos celulares e biomassa seca produzidos pelas células cultivadas nos meios controle (Watanabe) e água de resíduo sem adição de uréia (ARP<sub>0</sub>), foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade. Para os conteúdos celulares, de células cultivadas em ARP, que apresentaram valores superiores aos dos encontrados nas células cultivadas em Watanabe foi adicionalmente realizada uma análise de regressão dos valores de conteúdo em função das adições de uréia ao meio de cultura. E para estudar o efeito das concentrações de uréia nos meios de cultivo, foi realizada análise de Regressão nas curvas de crescimento. As análises foram realizadas utilizando-se o software SAS 9.2 (2010).

## 5. Resultados

### 5.1. Cultivo de *Chlorella* sp. em ARP

#### 5.1.1. Curvas de crescimento de *Chlorella* sp.

A partir dos dados de conteúdo de clorofila a foram ajustadas equações cinéticas com auxílio do programa estatístico CurveExpert 1.4. Selecionou-se os modelos de Gompertz, para os meios de cultura Watanabe e ARP<sub>3</sub>, Logístico para os meios ARP<sub>0</sub> e ARP<sub>2</sub> e Racional para o meio ARP<sub>1</sub>, buscando encontrar a equação que melhor se ajusta ao perfil de crescimento da microalga no meio de cultura (Figura 1 e Figura 2).

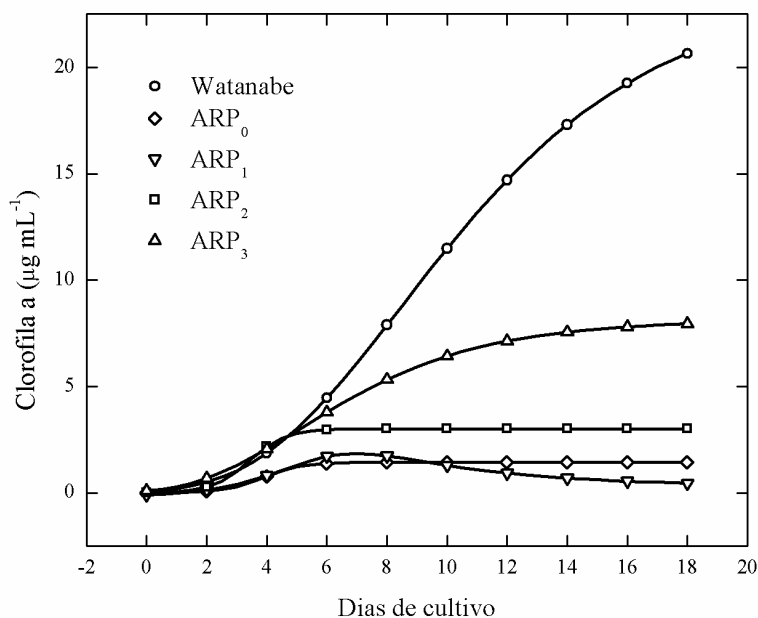


Figura 1 – Perfis das curvas de crescimento, baseado no conteúdo de clorofila a versus tempo, de *Chlorella* sp. em meios Watanabe, ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>.

O conteúdo de clorofila a em *Chlorella* sp. foi maior no tratamento controle (20 µg mL<sup>-1</sup>) do que nos meios com água residuária com diferentes dosagens de uréia. Entre os meios alternativos, o meio ARP<sub>3</sub> foi o que apresentou o maior valor de clorofila a (9 µg mL<sup>-1</sup>).

Em todos os tratamentos observou-se, inicialmente, um período de adaptação (fase lag) que variou, aproximadamente, dois dias. O crescimento celular nos meios ARP<sub>0</sub> e ARP<sub>2</sub> apresentou um fase log curta, com duração de cerca de cinco dias, enquanto que nos meios ARP<sub>1</sub> foi de sete dias e os meios ARP<sub>3</sub> e Watanabe, a fase log foi três vezes mais longa. O crescimento teve duração de aproximadamente 16 dias (Figura 2).

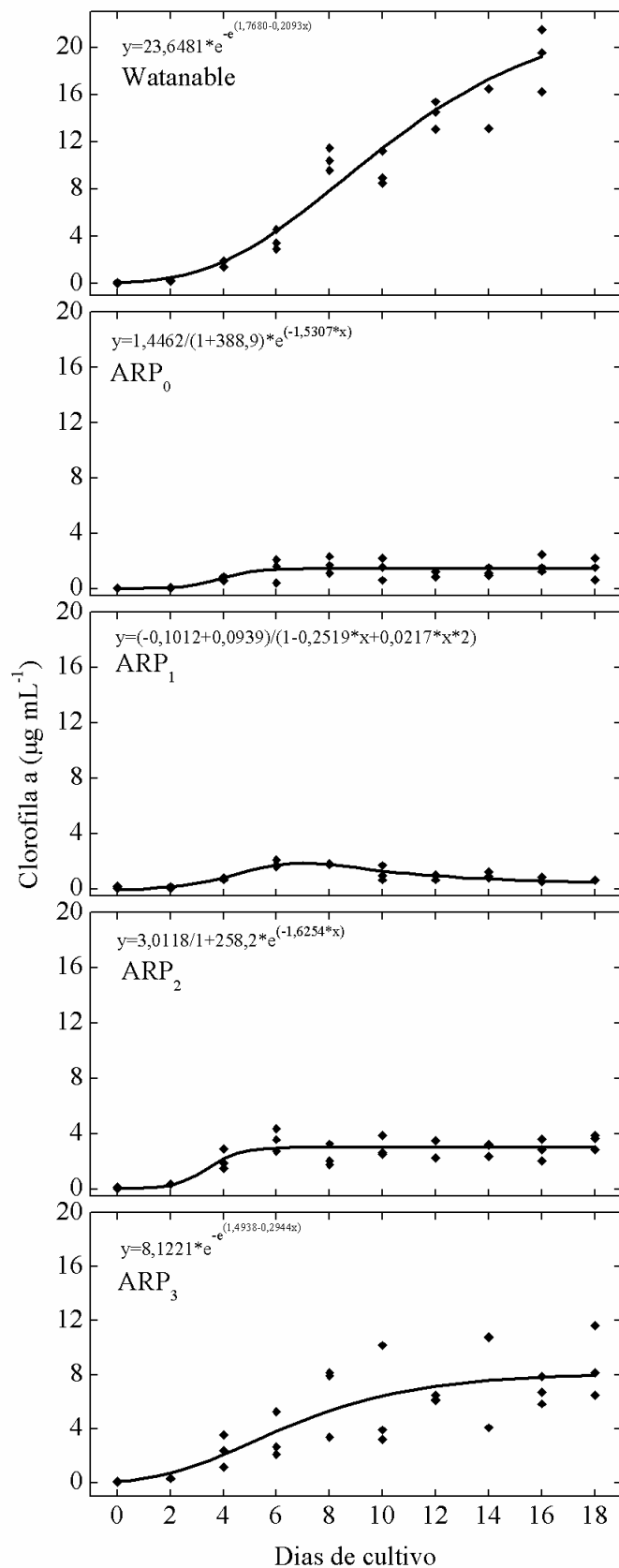


Figura 2 – Curvas de crescimento de *Chlorella* sp. (conteúdo de clorofila a versus tempo).



A Tabela 3 compara a produção de biomassa de *Chlorella* sp. cultivada nos meios Watanabe e água residuária sem suplementação de uréia (ARP<sub>0</sub>), com e sem fluxos de CO<sub>2</sub>. A utilização de água de resíduo, como meio de cultivo, mostrou efeito positivo na produção de biomassa (massa seca) (ARP<sub>0</sub> 0,88 g L<sup>-1</sup> e Watanabe 0,28 g L<sup>-1</sup>). A injeção de CO<sub>2</sub> nos cultivos estimulou a produção de biomassa, tanto no tratamento controle como nos meios com água de resíduo, entretanto, não houve diferença estatística entre eles.

A produtividade de biomassa em *Chlorella* sp. foi maior em ARP<sub>0</sub> (48,96 mg L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>) do que em Watanabe (15,29 mg L<sup>-1</sup> dia) (Tabela 3). Assim como, no cultivo com injeção de CO<sub>2</sub> esta aumentou no meio Watanabe, mas não foi significativamente (a 5% de probabilidade) maior no meio ARP<sub>0</sub>. A produtividade no meio alternativo permaneceu mais elevada do que em meio sintético. As dosagens de uréia não surtiram efeito na produtividade de biomassa, não sendo observadas diferenças estatísticas.

Tabela 3 – Produção de biomassa seca e produtividade de biomassa em *Chlorella* sp. cultivada em meio Watanabe (W) e em água residuária sem adição de uréia (ARP<sub>0</sub>) na presença (+) e ausência (-) de CO<sub>2</sub>.

Meio	Biomassa Seca final (g L <sup>-1</sup> )			Prod. biomassa final (mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )		
	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média
	-	+		-	+	
W	0,28 bB	1,05 aA	0,66	15,29 bB	58,40 aA	36,85
ARP <sub>0</sub>	0,88 aB	1,23 aA	1,06	48,96 aB	68,50 aA	58,73
Média	0,58	1,14		36,12	63,46	

Para cada variável resposta, as médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula numa mesma coluna, ou, por pelo menos uma mesma letra maiúscula numa mesma linha não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste F a 5% de probabilidade.

### 5.1.2. Conteúdos celulares de *Chlorella* sp.

Em relação a produção de proteínas hidrossolúveis, não foram detectadas diferenças entre as porcentagens de proteínas hidrossolúveis obtidas no cultivo de *Chlorella* sp. nos meios Watanabe e ARP<sub>0</sub>. Entretanto, observou-se que a injeção de CO<sub>2</sub> nos cultivos estimulou o aumento do teor proteico, apesar de que entre eles não houve diferença significativa a 5 % de probabilidade (Tabela 4). O aumento das concentrações de uréia não mostrou diferenças significativas entre os meios ARP na ausência de CO<sub>2</sub>. Entretanto, a presença de CO<sub>2</sub> combinado ao aumento de uréia aumentou o teor de proteínas nos meios ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub> (Figura 3).

Tabela 4 – Conteúdos celulares (proteínas hidrossolúveis, carboidratos totais, lipídeos totais e produtividade lipídica) de *Chlorella* sp. cultivada em Watanabe (W) e em água residuária sem adição de uréia (ARP<sub>0</sub>) na presença (+) e ausência (-) de CO<sub>2</sub>.

Meio	Proteínas Hidrossolúveis (%)			Carboidratos Totais (%)			Lipídeos Totais (%)			Prod. Lipídica (mg L <sup>-1</sup> )		
	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média
	-	+		-	+		-	+		-	+	
W	3,00	5,25	4,13 a	28,57 bB	32,79 bA	30,68	10,04 aA	6,80 aB	8,42	17,90 bB	35,65 aA	26,77
ARP <sub>0</sub>	3,15	7,41	5,28 a	43,04 aA	38,07 aB	40,55	8,11 bA	7,21 aA	7,66	40,38 aA	41,79 aA	41,08
Média	3,08 B	6,33 A		35,80	35,43		9,07	7,00		29,14	38,72	

Para cada variável resposta, as médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula numa mesma coluna, ou, por pelo menos uma mesma letra maiúscula numa mesma linha não diferem entre si estatisticamente pelo teste F a 5% de probabilidade.

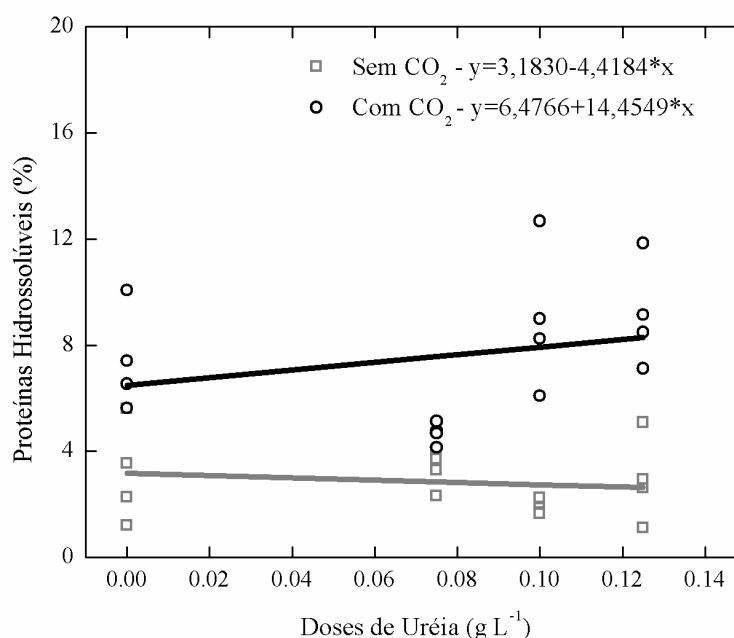


Figura 3 – Relação entre diferentes doses de uréia na produção de proteínas hidrossolúveis em *Chlorella* sp. cultivada em água residuária (ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>).

A produção de carboidratos foi 1,5 vezes maior no meio ARP<sub>0</sub> comparando-o com o meio sintético. No cultivo com injeção de CO<sub>2</sub>, observou-se que as concentrações de açúcares aumentaram no meio controle (32,79 %), sendo que no meio ARP<sub>0</sub> o conteúdo de açúcares diminuiu de 43,04 para 38,07 % (Tabela 4). Analisando a regressão que apresenta as respostas a diferentes dosagens de uréia, na síntese de carboidratos em meio ARP (Figura 4), observou-se que houve uma relação direta entre a concentração de uréia fornecida e a redução do teor de carboidratos.

A análise para quantificação de lipídeos totais revelou que a produção de lipídeos em meio sintético (10,04 %) foi maior do que no meio ARP<sub>0</sub> (8,11 %) (Tabela 4). Com o incremento na concentração de CO<sub>2</sub>, as células no meio Watanabe apresentaram concentrações menores de lipídeos, enquanto que no meio ARP<sub>0</sub> não houve diferença no conteúdo celular de lipídeos na presença de CO<sub>2</sub>. A produção de lipídeos nas células, em relação as diferentes doses de uréia nos meios ARP (Figura 5) mostrou-se adverso, ou seja, o aumento do teor de uréia implicou em resultado negativo para a síntese de lipídeos totais.

A produtividade lipídica apresentou valores mais elevados nas células no meio ARP<sub>0</sub> (40,38 mg L<sup>-1</sup>), sendo que os valores obtidos foram 2,25 vezes superior do que no meio Watanabe (17,90 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 4). A presença de CO<sub>2</sub> aumentou a produtividade somente no meio Watanabe. Nos tratamentos com diferentes dosagens de uréia, as maiores concentrações de lipídeos por litro obtidas foram observadas em meio em que foram adicionadas menores doses, ou não foram adicionadas dose nenhuma de uréia no meio, independente da suplementação ou não de CO<sub>2</sub> no meio (Figura 6).

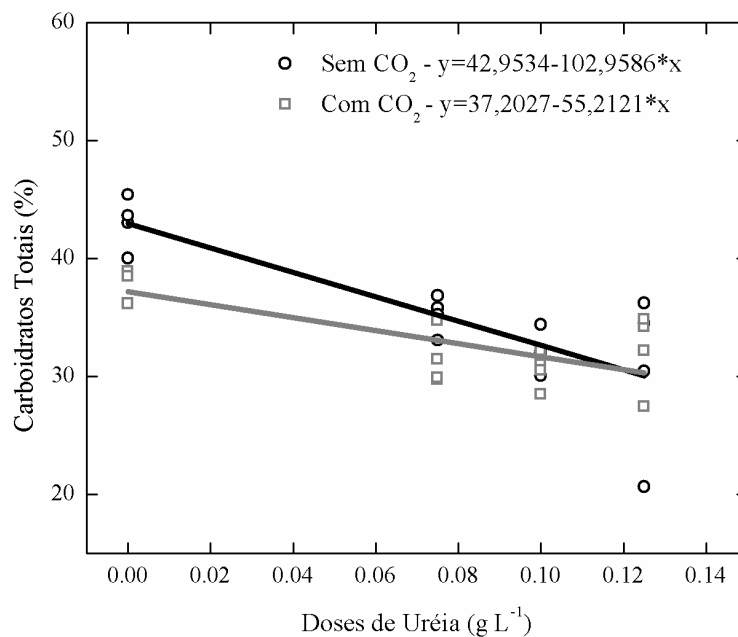


Figura 4 – Relação entre diferentes doses de uréia na produção de carboidratos totais em *Chlorella sp.* cultivada em água residuária (ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>).

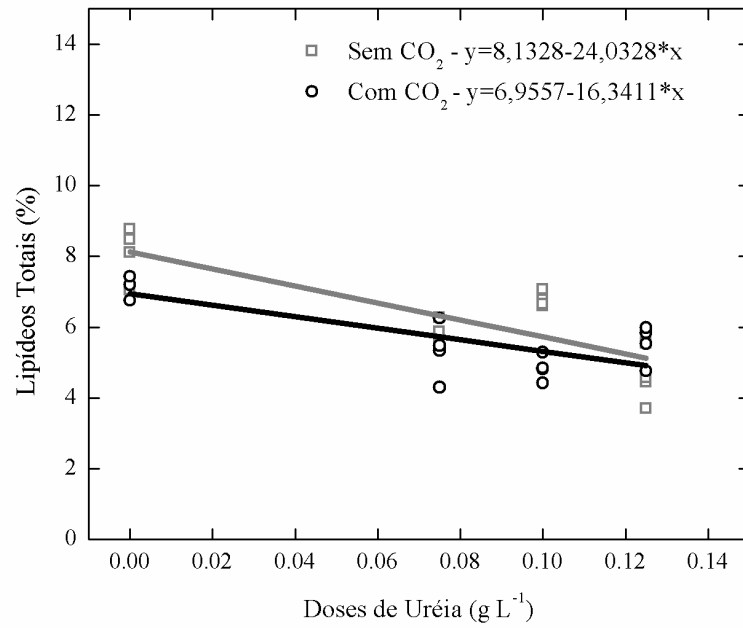


Figura 5 – Relação entre diferentes doses de uréia na produção de lipídeos totais em *Chlorella* sp. cultivada em água residuária (ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>).

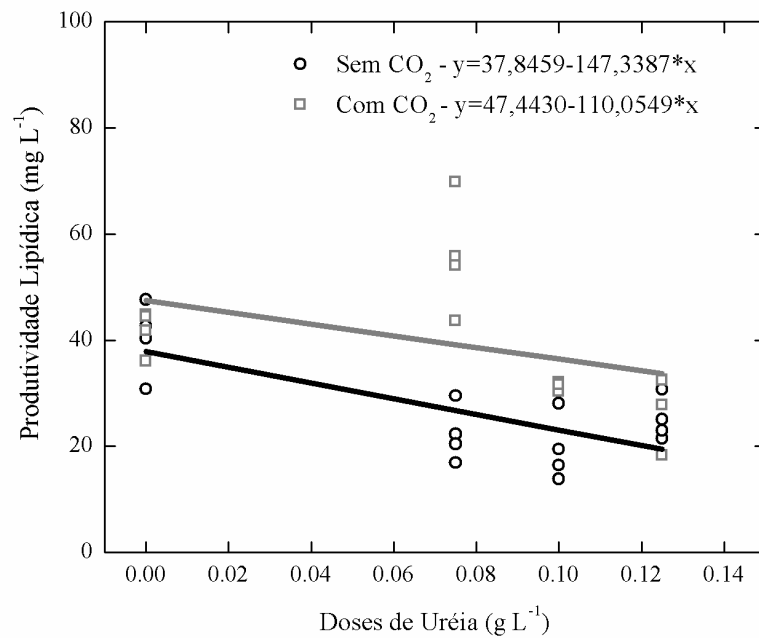


Figura 6 – Relação entre diferentes doses de uréia na produtividade lipídica totais em *Chlorella* sp. cultivada em água residuária (ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>).

## 5.2. Cultivo de *Ankistrodesmus* sp. em ARP

### 5.2.1. Curvas de crescimento de *Ankistrodesmus* sp.

Equações cinéticas, a partir dos dados de conteúdo de clorofila a, foram ajustadas aos modelos Logístico, para os meios Watanabe, ARP<sub>0</sub> e ARP<sub>3</sub>, e modelo Cúbico, para os meios ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>1</sub>, buscando selecionar a equação que melhor se adequa ao perfil de crescimento da microalga nos meios estudados.

Em ARP<sub>2</sub> foram observados os maiores conteúdos de clorofila a (Figura 7) durante o 14º dia de crescimento. *Ankistrodesmus* sp. mostrou longos períodos de adaptação do organismo no meio (fase lag), inclusive no tratamento controle (3 dias). As células entraram em crescimento exponencial somente a partir do terceiro dia de cultivo (meio Watanabe) (Figura 8).

A produção de biomassa seca de *Ankistrodesmus* sp. não apresentou diferenças entre os meios Watanabe e ARP<sub>0</sub> (Tabela 5), obtendo-se valores de 0,72 g L<sup>-1</sup> e 0,62 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

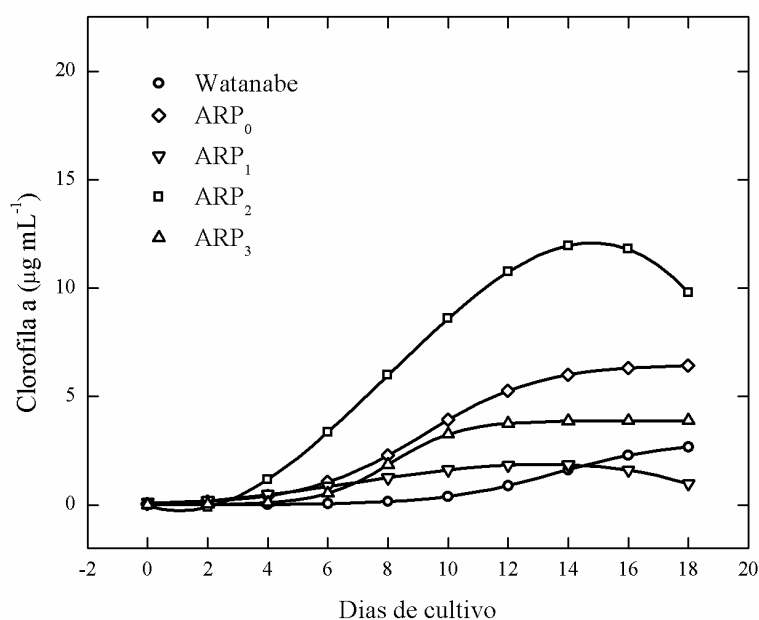


Figura 7 – Perfis das curvas de crescimento, em teor de clorofila a por tempo, de *Ankistrodesmus* sp. nos meios Watanabe, ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>.

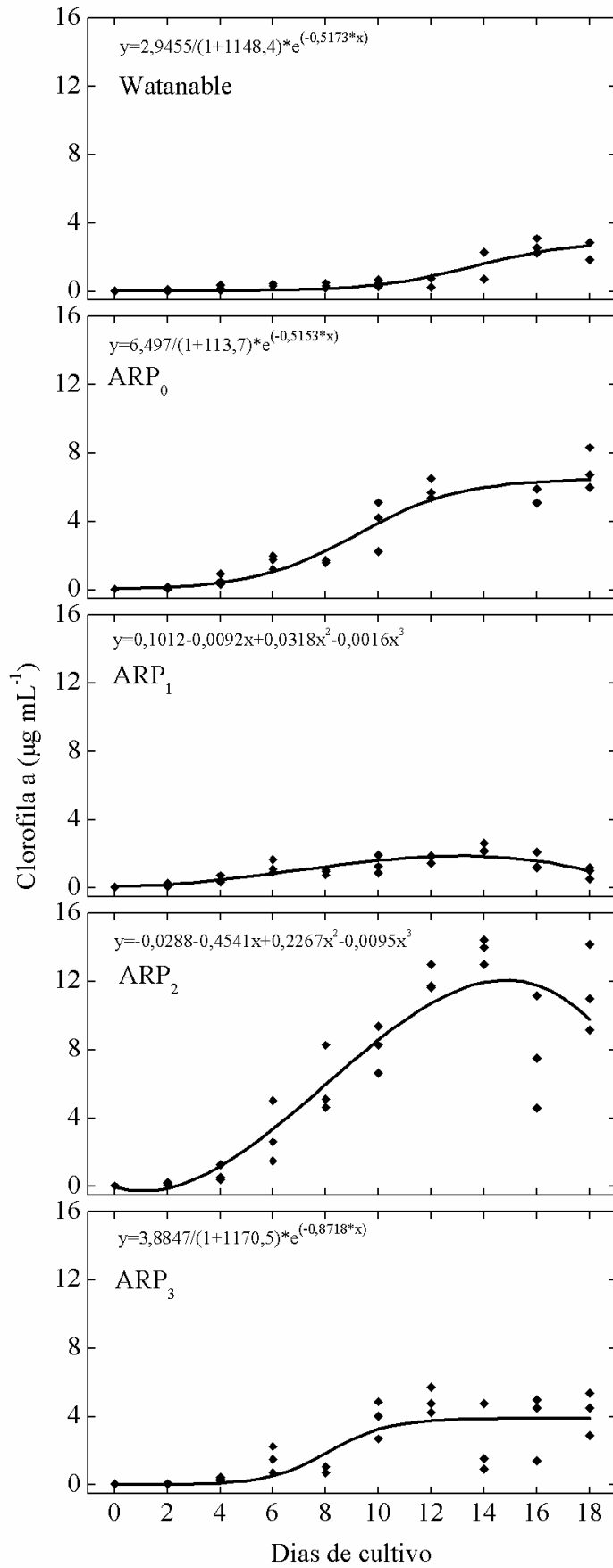


Figura 8 – Curvas de crescimento de *Ankistrodesmus* sp. baseado no conteúdo de clorofila a versus tempo.

As diferentes doses de uréia e concentrações de CO<sub>2</sub> não interferiram nas quantidades de massa seca produzida, não exibindo diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 5 – Produção de biomassa seca e produtividade em *Ankistrodesmus* sp. cultivado em meio Watanabe (W) e em água residuária sem adição de uréia (ARP<sub>0</sub>) na presença (+) e ausência (-) de CO<sub>2</sub>.

Meio	Biomassa seca final (mg L <sup>-1</sup> )			Prod. biomassa final (mg L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup> )		
	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média
	-	+		-	+	
W	0,45	0,72	0,58 a	12,91	25,23	19,07 a
ARP <sub>0</sub>	0,39	0,62	0,50 b	12,69	26,54	19,62 a
Média	0,042 A	0,67 B		12,80 A	25,88 B	

Para cada variável resposta, as médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula numa mesma coluna, ou, por pelo menos uma mesma letra maiúscula numa mesma linha não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste F a 5% de probabilidade.

### 5.2.2. Conteúdos celulares em *Ankistrodesmus* sp.

Na quantificação de proteínas hidrossolúveis, constatou-se que o tratamento controle apresentou uma maior produção de proteínas (13,58 %). A presença de maiores concentrações de dióxido de carbono estimulou o aumento de proteínas nas células cultivadas em ambos os meios (Tabela 6). Não foram constatadas diferenças significativas (5 % de probabilidade) entre as dosagens de uréia nos meios, no entanto, a presença de CO<sub>2</sub> contribuiu para aumentar o teor proteico das células nos meios em que houve aumento de nitrogênio (Figura 9).

Tabela 6 – Conteúdos celulares (proteínas hidrossolúveis, carboidratos, lipídeos totais e produtividade lipídica) em *Ankistrodesmus* sp. cultivada em meios Watanabe (W) e em água residuária sem adição de CO<sub>2</sub> (ARP<sub>0</sub>) na presença (+) e ausência (-) de CO<sub>2</sub>.

Meio	Proteínas hidrossolúveis (%)			Carboidratos totais (%)			Lipídeos totais(%)			Prod. Lipídica (mg L <sup>-1</sup> )		
	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média	CO <sub>2</sub>		Média
	-	+		-	+		-	+		-	+	
W	9,99	17,16	13,58 a	43,92 aA	31,71 bB	37,82	6,68	2,35	4,51 a	33,19 aA	17,42 aB	25,31
ARP <sub>0</sub>	5,78	13,49	9,64 b	25,57 bB	35,74 aA	30,65	4,64	1,58	3,11 b	15,20 bA	15,35 aA	15,28
Média	7,89 B	15,33 A		34,74	33,72		5,66 A	1,96 B		24,20	16,39	

Para cada variável resposta, as médias seguidas por pelo menos uma mesma letra minúscula numa mesma coluna, ou, por pelo menos uma mesma letra maiúscula numa mesma linha não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste F a 5% de probabilidade.

Na determinação de carboidratos totais foi constatada maior porcentagem de açúcares nas células cultivadas no meio sintético (43,92 %) do que no meio ARP<sub>0</sub> (25,57 %). A adição de CO<sub>2</sub> ao meio Watanabe provocou queda na produção de carboidratos (31,71 %), e aumento no meio ARP<sub>0</sub> (35,74 %). As diferentes doses de uréia adicionadas no meio ARP<sub>0</sub> não causaram alterações no componente bioquímico.

O conteúdo de lipídeos totais em *Ankistrodesmus* sp. foi maior no meio Watanabe (4,51 %) do que no tratamento ARP<sub>0</sub> (3,11 %). Na presença de CO<sub>2</sub> o teor de lipídeos da microalga cultivada em ambos os meios diminuiu. A produtividade lipídica de *Ankistrodesmus* sp. apresentada no meio Watanabe foi mais elevada (33,19 mg L<sup>-1</sup>) do que no meio ARP<sub>0</sub> (15,20 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 6). O aumento da concentração de uréia não mostrou diferença estatística na produção de lipídeos.

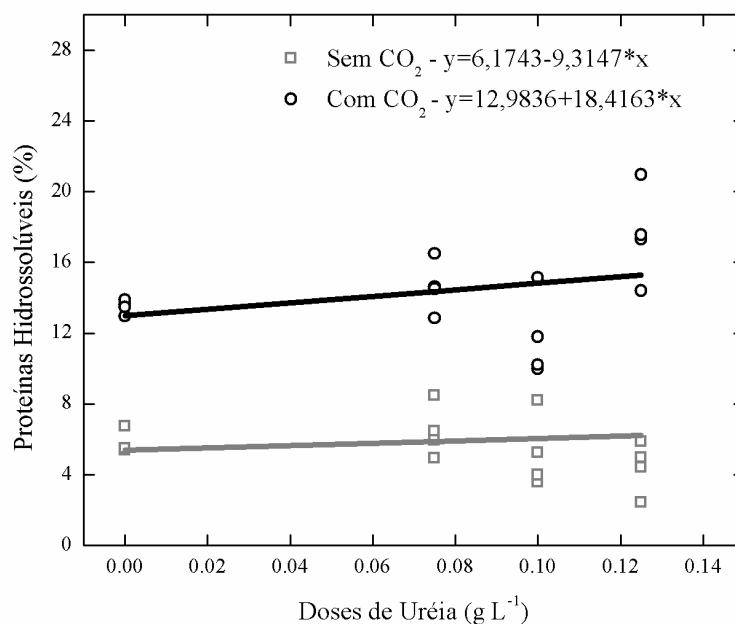


Figura 9 – Relação entre diferentes doses de uréia na produção de proteínas hidrossolúveis, em *Ankistrodesmus* sp., cultivada em água residuária (ARP)

A produtividade lipídica observada em células cultivadas no tratamento controle foi maior do que aquela constatada no meio ARP<sub>0</sub>. Quando a microalga foi cultivada na presença de CO<sub>2</sub>, a produtividade diminuiu no tratamento controle, mas não alterou-se no meio com água residuária (Tabela 6). As diferentes concentrações de uréia não interferiram na produtividade lipídica, não havendo diferença entre os tratamentos.



## 6. Discussão

As diferentes composições dos meios de cultivo afetam diretamente a produção de células e os conteúdos celulares de espécies de microalgas. A clorofila **a** é um dos componentes celulares utilizados para estimar a biomassa em cultivos de microalgas, sendo usada como medida de crescimento (Valenzuela-Espinoza et al., 2001), e que também, terá o seu conteúdo alterado em função das diferentes concentrações de nutrientes no meio, de acordo com a cepa estudada.

No cultivo de *Chlorella* sp., os maiores conteúdos de clorofila **a** foram encontrados quando as células foram cultivadas no meio Watanabe, sendo este o tratamento com maiores concentrações de nitrogênio (N). Os menores valores do conteúdo de clorofila **a** puderam ser observados nos tratamentos com menores concentrações de nitrogênio no meio. Estes dados corroboram com os apresentados por Mutlu et al. (2011), que mostraram que os menores valores de conteúdo de clorofila **a** foram encontrados em células de *Chlorella vulgaris* cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio.

Por outro lado, *Ankistrodesmus* sp. apresentou maior conteúdo de clorofila **a** no meio ARP<sub>2</sub>. Existem relatos na literatura de que esta microalga pode apresentar alterações em suas rotas metabólicas quando cultivada com deficiência de fósforo (P) (Kilham et al., 1997), sendo que a concentração de P na água de resíduo utilizada nos cultivos foi baixa (Anexo 1). Mutlu et al. (2011) relatam que em cultivo de *Chlorella vulgaris*, a limitação de P em presença de uma fonte nitrogenada (nitrato) causou um aumento no teor de clorofila **a** quando comparado ao meio controle utilizado no experimento.

A utilização da água de resíduo proveniente de efluente petroquímico (meios ARP) demonstrou resultados satisfatórios para o cultivo das cepas *Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp.. Trabalhos utilizando-se água residuária com resultado semelhante são relatados na literatura para os cultivos de *Botryococcus braunii*, *Dunaliella tertiolecta* e *Pleurochrysis carterae*, em água de efluente pré-tratado de indústria de carpetes, demonstrando ser esta água mais eficaz na produção de biomassa algal do que quando em meio sintético BG 11 (Chinnasamy et al., 2010). No cultivo de *Isochrysis* aff. *galbana*, foi mostrado que a produção de biomassa, a partir de meio a base de fertilizante agrícola, foi equivalente a produção em meio de cultivo sintético F2 (Venezuela-Espinoza et al., 2001).

*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. tiveram significativa produção de biomassa ao serem cultivados nos meios ARP, que por sua vez apresentaram em sua composição elevada concentração de sais dissolvidos (Anexo 1). De forma similar, a espécie *Chlorella*

protothecoides, uma microalga de água doce, não teve diminuição na produção de biomassa quando cultivada em diferentes salinidades, inclusive na concentração de 35 g L<sup>-1</sup> de salinidade, concentração essa equivalente a da água do mar (Heredia-Arroyo et al., 2010). Essa característica deve ser levada em consideração, uma vez que quando cultivadas em grande escala, o risco de contaminação com outras microalgas será menor, devido ao fato de que nem todas as espécies de microalgas conseguem crescer em ambientes tão seletivos (Richmond, 2004).

As concentrações de N presentes na água residuária (Tabela 1) podem ser comparadas àquelas propostas por Illman et al. (2000), em meio de cultivo com baixa concentração de N. A produção de biomassa de *Chlorella* sp. em meio ARP<sub>0</sub> (0,88 g L<sup>-1</sup>) foi superior a biomassa obtida no cultivo dessa mesma espécie quando no meio Watanabe (0,28 g L<sup>-1</sup>). Os dados corroboram com os encontrados por Illman et al. (2000), em que espécies de *Chlorella* spp. cultivadas com baixo teor de nitrogênio alcançaram maior produção de biomassa do que quando cultivadas em meio Watanabe (Illman et al., 2000). Além disso, a elevada concentração de íons bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) presentes na água de resíduo (1,48 g L<sup>-1</sup>) (Tabela 1) pode ter sido um dos fatores que contribuíram para esse ganho de biomassa, visto que íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> são uma fonte de carbono que pode ser utilizado para o crescimento efetivo da microalga (Grobbelaar, 2004).

A utilização de CO<sub>2</sub> nos cultivos das duas microalgas mostrou aumentos significativos na geração de biomassa, com exceção de *Ankistrodesmus* sp. em meio ARP<sub>0</sub> que não apresentou diferença na ausência ou presença do gás. Da mesma forma, cultivos realizados em consórcio de microalgas à temperatura de 25 °C com injeção de CO<sub>2</sub> (6 %) tiveram a produtividade de biomassa aumentada em 12,5 vezes (Chinnasamy et al., 2010). Similarmente, *Chlorella vulgaris* teve sua biomassa duplicada quando cultivada sob temperatura de 30 °C com injeção de CO<sub>2</sub> (6 %) (Chinnasamy et al., 2009). Chiu et al. (2009) alegaram que uso de CO<sub>2</sub> no cultivo de *Nannochloropsis oculata*, comparando-se a meios apenas enriquecidos com fluxos de ar, aumentam a produção de biomassa, uma vez que a presença deste gás supre a limitação de carbono que poderia haver no meio de cultivo.

Sterner et al (1994) relataram que não houve diferenças no conteúdo proteico de *Scenedesmus* quando cultivado sob condições moderadas de limitação de nitrogênio. No cultivo de *Chlorella* sp. a produção proteica não diferiu entre os tratamentos, sendo encontradas baixas concentrações deste componente nas células algais, exceto quando o meio foi suplementado com CO<sub>2</sub> com maiores concentrações de uréia (ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>). Nesse caso foi observado aumento do teor de proteínas.

O conteúdo de proteínas de *Ankistrodesmus* sp. apresentou-se menor quando o cultivo foi realizado no meio ARP<sub>0</sub> do que no meio Watanabe. Dados semelhantes foram obtidos no cultivo de *A. falcatus*, em que o teor proteico passou de 1,17 ( $\mu\text{g cell}^{-1}$ ) x 10<sup>5</sup> para 0,54 ( $\mu\text{g cell}^{-1}$ ) x 10<sup>5</sup> (Kiham, 1997) quando as células algais foram submetidas a baixas concentrações de N. O cultivo com injeção de CO<sub>2</sub> provocou aumento no teor de proteínas conforme aumentou-se a concentração de uréia no meio. Estes dados corroboram com os valores encontrados por Chinnasamy et al. (2009), em que foi relatado que na presença de CO<sub>2</sub> (6%), a produção de proteínas foi maior que o dobro do que as encontradas sem injeção deste gás.

A metodologia utilizada para quantificação do teor de proteínas hidrossolúveis (Bradford, 1976), já foi relatada por subestimar o conteúdo proteico em microalgas. Grande parte destes micro-organismos apresenta em sua composição poucos aminoácidos que servem como sítio de ligação para o reagente Comasie Brilliant Blue G-250 (Barbarino et al., 2005), obtendo-se no final do processo um valor abaixo do esperado.

O baixo teor de proteínas pode ser atribuído também ao tempo de cultivo. A concentração dos conteúdos celulares de *Chlorella vulgaris* durante os dias de cultivos foi alterada, sendo que o teor de proteínas diminuiu de 70 %, no início do cultivo, para 7 % após 230 horas de cultivo (Lv et al., 2010). Uma hipótese para explicar os baixos teores proteicos encontrados, está no fato de que o cultivo de *Chlorella* sp. foi conduzido durante o período de 18 dias (430 horas). Ao final do experimento, as concentrações das fontes nitrogenadas poderiam ter se esgotado, ficando o teor proteico abaixo do esperado. Sugere-se desta forma que o tempo de cultivo seja diminuído para essa cepa.

Teores mais baixos de carboidratos foram encontrados em *Ankistrodesmus* sp. quando cultivado em meio com baixa concentração de N (ARP<sub>0</sub>). Illman et al. (2000) relataram que no cultivo de espécies de *Chlorella* (*C. emersonii*, *C. protothocoides*, *C. sorokiniana* e *C. minutissima*) sob a mesma condição (deficiência de N), foi observado menores teores de carboidratos do que em meio Watanabe. Em contrapartida, neste trabalho, uma maior produção de carboidratos foi obtida quando o cultivo com baixa concentração de N foi conduzido com a cepa *Chlorella* sp.. Os aumentos dos teores de carboidratos foi observado quando *Chlorella vulgaris* foi cultivada em concentrações menores de N (Illman et al., 2000).

Os baixos teores lipídicos apresentados pelas duas microalgas estudadas em todos os meios de cultivo podem ser explicados pelo fato de que a recuperação da biomassa foi realizada na fase estacionária tardia. Alguns trabalhos relatam a importância das diferentes fases do crescimento e o comportamento dos componentes celulares durante essas fases

(Hu et al., 2008; Lv et al., 2010). Geralmente, são apresentados maiores teores lipídicos no início da fase estacionária (Lv et al., 2010). Com o passar do tempo, as células que haviam acumulado lipídeo, como material de reserva, começam a utilizar esse componente celular, devido a diminuição de nutrientes no meio.

A produtividade lipídica observada em *Chlorella* sp. cultivada nos diferentes meios ARP (ARP<sub>0</sub>, ARP<sub>1</sub>, ARP<sub>2</sub> e ARP<sub>3</sub>), apresentou resposta inversamente proporcional as concentrações de uréia. De forma semelhante, no cultivo de *Neochloris oleoabundans*, as maiores produtividades lipídicas foram alcançadas em meio de cultura com baixas concentrações de nitrogênio, sendo que na concentração de 5mM de NaNO<sub>3</sub> a microalga produziu 0,133 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, enquanto que na concentração de 20 mM a produtividade caiu para 0,038 g L<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> (Li et al., 2008b). Também foi observado que as produtividades lipídicas de *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis oculata*, cultivadas em diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub>, apresentaram resposta semelhante (Convetti et al., 2009).

No presente estudo, o teor de lipídeos encontrado em *Chlorella* sp. foi considerado baixo. Entretanto, a significativa produção de biomassa da microalga favoreceu a elevada produtividade lipídica, sendo esta maior que as encontradas no meio convencional (Watanabe). Desta forma, observa-se que a viabilidade do cultivo depende não somente dos teores de lipídeos, mas também de elevada produtividade lipídica, na qual é levada em consideração a geração de biomassa da microalga. Espécies com elevado teor lipídico e baixa produção de biomassa não podem ser apontadas como potenciais para geração de óleo devido a baixa produtividade lipídica (Li e Qin, 2005).

## 7. Conclusão

A água residuária de efluente petroquímico (ARP), mostrou-se um meio de cultivo eficaz para o crescimento da microalga *Chlorella* sp..

A geração de biomassa apresentada pela cepa *Ankistrodesmus* sp. foi igual a obtida pelo meio Watanabe usado em cultivo de laboratório, sendo viável a utilização dos meios ARP, em substituição a esse meio convencional .

A elevada produção de biomassa em *Chlorella* sp. a coloca como uma promissora cepa para futuros trabalhos em escala industrial. Apesar dos baixos teores lipídicos observados na microlaga, a produtividade lipídica foi elevada, tornando o cultivo economicamente viável.

A presença de CO<sub>2</sub> nos cultivos de *Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. elevou as taxas de crescimento, no entanto não houve aumento na produtividade lipídica.

A presença de uréia não interferiu de forma positiva nos cultivos, pelo contrário, quanto maiores suas concentrações, menores os valores dos conteúdos de interesse para indústria de biocombustíveis se tornavam (produtividade lipídica e produtividade de biomassa). Esse resultado é de grande valia, visto que os melhores resultados foram observados no tratamento ARP<sub>0</sub>, ou seja, sem adição de uréia. Tal fato faz com que a produção tenha maior viabilidade, uma vez que não é necessário suplementar a água com fontes nitrogenadas.

Trabalhos futuros visam a utilização desta mesma água fora do ambiente controlado de laboratório, tentando simular de uma forma mais próxima da realidade, as possíveis repostas geradas pelas microalgas em maior escala.

O grande desafio para a produção de biomassa de microalgas em grande escala, de forma que o cultivo torne-se viável para a produção de biocombustíveis, é vencer a alta produtividade obtida em meios artificiais.

## 8. Referências Citadas

- Aguiar, R. E. (2000) Systematic and ultrastructure of new and rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming lakes. Ph. D. Dissertation. Colorado. Colorado State University. USA. 280p.
- Antoni, D., Zverlov, V. V., Schwarz, H. (2007) Biofuels from Microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:23–35. doi:10.1007/s00253-007-1163-x.
- Barbarino, E., Louren, S.O. (2005) An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro and microalgae. *Journal of Applied Phycology* 17:447-460. doi:10.1007/s10811-005-1641-4.
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., Das, K.C. (2010) *Chlorella minutissima* — A promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161:523–536. doi:10.1007/s12010-009-8771-0.
- Bicudo, C.E. de M., Menezes, M. (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições, 2ª ed. São Carlos, São Paulo.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, W.H., Das, K.C. (2010) Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101:3097–3105. doi:10.1016/j.biortech.2009.12.026.
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A. e. Das, K.C. (2009) Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO<sub>2</sub> and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 10:518-532. doi:10.3390/ijms10020518.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- Chiu, S.Y., Kao, C.Y., Tsai, M.T., Ong, S.C., Chen C.H. e Lin, C.S. (2009) Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration. *Bioresource Technology*, 100:833–838. doi:10.1016/j.biortech.2008.06.061.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. e Borghi, M. D.(2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of

- Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48:1146–1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006.
- Dere, S., Güneş, T., Sivaci, R. (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany* 22:13-17.
- Derner, R. B. (2006) Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição química das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 140p.
- Feng, Y., Li, C., Zhang, D. (2011) Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology* 102:101–105. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.016.
- Gouveia, L., Oliveira, A.C. (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36:269–274. DOI 10.1007/s10295-008-0495-6.
- Griffiths, M.J., Harrison, S.T.L. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21:493–507. DOI10.1007/s10811-008-9392-7.
- Grobbelaar, J.U. (2004) Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science.
- Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T. (2009) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research* 102:523–540. DOI10.1007/s11120-009-9415-5.
- Heredia-Arroyo, T., Wei, W. e Hu, B. (2010) Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 162:1978–1995. doi:10.1007/s12010-010-8974-4.
- Hsieh, C.H., Wu, W.T. (2009) Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology* 100:3921–3926.
- Hu, Q.; Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M.; Posewitz, M., Seibert, M. e Darzins, A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54:621–639.
- Huber-Pestalozzi, G. (1983) *Das phytoplankton des subwassers: systematik und biologie*. Stuttgart; E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung.

- Illman, A. M., Scragg, A. H., Shales, S. W. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27:631–635.
- Joseph, V., Joseph, A. (2001) Algae in the Assessment of Industrial Wastewater Holding Ponds. *Water, Air and Soil Pollution* 132: 251–261.
- Kilham, S., Kreeger, D.A., Goulden, C.E., Lynn, S.G. (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38: 591-596.
- Korchert, G. (1978) Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. In: Hellembust, J. A.; Craigie, J. S. (eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge: Cambridge University. p. 95-97.
- Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008a) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80:749–756. DOI10.1007/s00253-008-1625-9.
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008b) Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:629–636. doi:10.1007/s00253-008-1681-1.
- Li, Y., Qin, J.G. (2005) Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. *Journal of Applied Phycology* 17:551–556. doi:10.1007/s10811-005-9005-7.
- Liu, Z.Y., Wang, G., Zhou, B.C. (2008) Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99:4717–4722. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.073.
- Lv, J.M, Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L (2010) Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* 101:6797–6804. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.120.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Meijer, E.A., Wijffels, R.H. (1998) Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnology Techniques* 12:353-358.
- Mohan, N., Rao, P.H., Kumar, R.R., Sivasankaran, S., Sivasubramanian V. (2009) Studies on mass cultivation of *Chlorella vulgaris* and effective harvesting of biomass by low-cost methods. *Journal of Algal Biomass Utilization* 01:29-39.
- Mutanda ,T., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandraj, A. Bux, F. (2011) Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology* 102:57–70. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.077.



- Mutlu, Y.B., Işık, O., Uslu, L., Koç, K. e Durmaz, Y. (2011) The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology*, 10:453-456.
- Pittman, J.K., Dean, A.D., Osundeko, O. (2011) The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102:17–25. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.035.
- Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, S. V. (2010) Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49:2979–2985.
- Richmond, A. (1986) Microalgae of economic potential. In: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U.C., Mussgnug, J.H., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Research* 1:20–43. DOI10.1007/s12155-008-9008-8.
- Shubert, L.E. (2003) Nonmotile coccoid and colonial green algae. In: Wehr, J.D. e Sheath, R.G. (eds.). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Academic Press.
- Shirai, F., Kunii, K., Sato, C., Teramoto, Y., Mizuki, E., Murao, S., Nakayama, S. (1998) Cultivation of microalgae in the solution from the desalting process of soy sauce waste treatment and utilization of the algal biomass for ethanol fermentation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 14:839-842.
- Singh, A., Nigam, S.P., Murphy, J.D. (2011a) Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Bioresource Technology* 102:10–16. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.032.
- Singh, A., Nigam, S.P., Murphy, J.D. (2011b) Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology* 102:26–34. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.057.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Pelicione, L.C., Olivera, A. (1999) Use of organic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Biology* 01:10-15.
- Sterner R.W., Robinson, J.L. (1994) Thresholds for growth in *Daphnia magna* with high and low phosphorus diet. *Limnology and Oceanography*, 39:1228-1232.
- Venezuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. (2002) 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* 25:207–216.
- Wang, B., Li, B., Wu, N., Lan, C.Q. (2008) CO<sub>2</sub> bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:707–718.

- Watanabe A. (1960) List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. *The Journal of General and Applied Microbiology* 6:283–292.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, Y. (2011) Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology* 102:159–165. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.017.