

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM AGRONOMIA - PPGA

LUIS FERNANDO SOUZA GOMES

**PRODUÇÃO DE *Scenedesmus subspicatus* ASSOCIADA COM MICRORGANISMOS  
NITRIFICANTES UTILIZANDO ÁGUA RESIDUÁRIA COMO MEIO DE CULTIVO  
ALTERNATIVO**

**Marechal Cândido Rondon**

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOUTORADO EM AGRONOMIA - PPGA

LUIS FERNANDO SOUZA GOMES

**PRODUÇÃO DE *Scenedesmus subspicatus* ASSOCIADA COM MICRORGANISMOS  
NITRIFICANTES UTILIZANDO ÁGUA RESIDUÁRIA COMO MEIO DE CULTIVO  
ALTERNATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal e linha de pesquisa em Sistemas de Produção Sustentáveis.

Orientador: Prof. D. Sc. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira  
Co-orientador: Prof. D. Sc. Armin Feiden  
Co-orientador: Prof. D. Sc. Nyamien Yahaut Sebastien

**Marechal Cândido Rondon**

**2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon –  
PR., Brasil)

G633p	<p>Gomes, Luis Fernando Souza Produção de <i>Scenedesmus subspicatus</i> associada com microrganismos nitrificantes utilizando água residuária como meio de cultivo alternativo / Luis Fernando Souza Gomes. - Marechal Cândido Rondon, 2013. 53 p.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira Coorientador: Prof. Dr. Armin Feiden Coorientador: Prof. Dr. Nyamien Yahaut Sebastien</p> <p>Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2013.</p> <p>1. <i>Scenedesmus subspicatus</i> - Cultivo - Água residuária - Cervajaria . 2. Biocombustível. 3. Biomassa algal. 4. Microalga. 5. BioaumentaçãoI. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.</p> <p>CDD 22.ed. 579.83 CIP-NBR 12899</p>
-------	---



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



**PARANÁ**

GOVERNO DO ESTADO

Ata da reunião da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Químico **LUIS FERNANDO SOUZA GOMES**. No primeiro dia do mês de julho de 2013, às 9 horas, sob a presidência do Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira, em sessão reservada, reuniu-se a Comissão Julgadora da Defesa da Tese do Químico Luis Fernando Souza Gomes, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Agronomia – Nível Mestrado e Doutorado, com área de concentração em **"PRODUÇÃO VEGETAL"**, visando à obtenção do título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, constituída pelos membros: Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel (UFPR - Palotina), Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Maria de Grandi (Unioeste), Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti (Unioeste – Campus de Toledo), Prof. Dr. Brener Magnabosco Marra (UFPR - Palotina) e Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira (Orientador).

Iniciados os trabalhos, o candidato apresentou seminário referente aos resultados obtidos e submeteu-se à defesa de sua tese, intitulada: **"Produção de *Scenedesmus subspicatus* associada com microrganismos nitrificantes utilizando água residuária como meio de cultivo alternativo"**.

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento dessa prova, cujo resultado foi o seguinte, observada a ordem de arguição:

Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel.....Aprovado  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Maria de Grandi.....Aprovado  
Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti.....Aprovado  
Prof. Dr. Brener Magnabosco Marra.....Aprovado  
Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira (Orientador).....Aprovado

Apurados os resultados, verificou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de **"DOUTOR EM AGRONOMIA"**, área de concentração: **"PRODUÇÃO VEGETAL"**. Do que, para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos senhores membros da Comissão Julgadora.

Marechal Cândido Rondon, 1º de julho de 2013.

Prof. Dr. Dile Pontarolo Stremel

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Maria de Grandi

Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti

Prof. Dr. Brener Magnabosco Marra

Prof. Dr. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira (Orientador)

*Se você está procurando uma grande oportunidade,  
descubra um grande problema.*

*Martinho Lutero*

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho a minha mãe, Marina;  
Minha esposa, Letícia aos filhos Eduardo, João Manoel e Luísa Fernanda (Di) os  
quais me ajudaram, incentivaram e compreenderam o que eu queria.*

## AGRADECIMENTOS

Aos professores do programa de pós graduação em Agronomia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Marechal Cândido Rondon, os quais contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho e com a ampliação dos meus conhecimentos, os quais levarei por toda minha vida.

Ao meu orientador Prof. D. Sc. Paulo Sérgio Rabello de Oliveira, por sua orientação na elaboração deste trabalho.

Aos meus co-orientadores Prof. D. Sc. Armin Feiden, por sua orientação e Prof. D. Sc. Nyamien Yahaut Sebastien , também por sua orientação juntamente com seu trabalho.

Ao Marcos Venicio Rosa, acadêmico de Engenharia de Pesca, pelo seu trabalho e dedicação.

Em especial, à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por ter possibilitado, além da minha graduação, também o meu aprimoramento, o qual me possibilitará melhores oportunidades na vida.

Aos colegas de curso pela amizade, companheirismo e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho na UFPR também pela amizade, companheirismo e auxílio, os quais irão se identificar neste trabalho, e vão lembrar as nossas reuniões no escritório do Bico.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

### **PRODUÇÃO DE *Scenedesmus subspicatus* ASSOCIADA COM MICRORGANISMOS NITRIFICANTES UTILIZANDO ÁGUA RESIDUÁRIA COMO MEIO DE CULTIVO ALTERNATIVO**

Grande parte dos problemas ambientais está relacionado com a exploração e utilização de energia, principalmente as mudanças climáticas associadas ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> na atmosfera, a qual compromete a produção vegetal. Como boa parte da tecnologia de produção está baseada em derivados de petróleo, não é difícil observar as vantagens do Brasil, com sua imensa capacidade de produção de energia a partir de fontes renováveis. Neste cenário surgem as algas como alternativas para a substituição das matérias-primas atualmente utilizadas, estas apresentam várias vantagens frente aos vegetais superiores como: alta eficiência fotossintética, alta velocidade de crescimento, alta produtividade de biomassa, etc. Podendo serem cultivadas em meios de culturas convencionais ou meios alternativos como águas residuárias. Também as limitações impostas pela diretiva 2009/28/CE do parlamento europeu, a qual limita ou impede que matérias-primas utilizadas para alimentação sejam utilizadas para produção de biocombustíveis. Apontando para o futuro dos biocombustíveis de terceira geração, produzidos a partir de biomassa algal. O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja, no processo produtivo é gerada uma grande quantidade de resíduos, principalmente águas residuárias. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo de microalga *Scenedesmus subspicatus* associada com microrganismos nitrificantes, como formas de bioaugmentação, utilizando como meio de cultivo alternativo água residuária de cervejaria. Através da caracterização físico-química da água residuária de cervejaria e testes de concentração avaliando-se as velocidades específicas de crescimento, determinando-se a produção de biomassa e de lipídios. Para o delineamento estatístico das velocidades específicas de crescimento adotou-se um esquema fatorial com 2 fatores e 2 níveis e repetições em um ponto, e para a produtividade de biomassa e teor de lipídios adotou-se o DIC com quatro tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste F e a comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A maior velocidade específica de crescimento foi obtida no tratamento com 100% água residuária bruta de cervejaria associada a um dos microrganismos nitrificantes,  $0,8427 \text{ d}^{-1}$ , o qual foi adotado nos tratamentos seguintes. Para produtividade de biomassa os tratamentos 1, 2 e 3, meio MC com microrganismo, meio MC sem microrganismo e água residuária de cervejaria com microrganismo, respectivamente, não apresentaram diferença significativa produzindo  $0,4988$ ,  $0,4815$  e  $0,4023 \text{ g L}^{-1} \text{ semana}^{-1}$ , respectivamente, sendo superiores ao tratamento 4, água residuária de cervejaria, que produziu  $0,1107 \text{ d}^{-1}$ , e para o teor de lipídios os tratamentos 4, 3, 1 e 2 apresentaram diferença significativa produzindo  $33,68$ ,  $22,81$ ,  $15,34$  e  $13,36\%$ , respectivamente, sendo o tratamento 4 superior aos demais podendo este ser associado a uma condição de estresse provocada pela relação não ideal das fontes de N, ou a um estado nutricional não adequado. A microalga *Scenedesmus subspicatus* apresentou uma produtividade de biomassa de  $0,4023 \text{ g L}^{-1} \text{ semana}^{-1}$  no tratamento 3, com um teor de lipídios de  $22,81\%$ , podendo produzir  $209.196 \text{ kg}$  de biomassa  $\text{ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , ou  $47.717,61 \text{ kg}$  de lipídios  $\text{ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ .

**Palavras chave:** Biocombustíveis, bioaugmentação, lipídios, cervejaria

## ABSTRACT

### ***Scenedesmus subspicatus* PRODUCTION ASSOCIATED WITH USING MICRO NITRIFYING WASTEWATER AS A MEANS OF ALTERNATIVE CROP**

Much of the environmental problems associated with the exploration and use of energy, especially climate change associated with the increased concentration of CO<sub>2</sub> in the atmosphere, which impairs the production plant. How much of the production technology is based on petroleum products, it is not difficult to see the advantages of Brazil, with its immense capacity for energy production from renewable sources. In this scenario arise algae as an alternative to the replacement of raw materials currently used, these have several advantages compared to the higher plants as high photosynthetic efficiency, high growth rate, high biomass productivity, etc. Can be grown in culture media conventional or alternative means as wastewater. The limitations imposed by the directive 2009/28/EC of the European Parliament, which limits or prevents the raw materials used for food to be used for biofuel production. Pointing to the future of biofuels of third generation, produced from biomass algal. The Brazil is the third largest producer of beer, in the productive process is generated a large amount of waste, mainly waters residuary. Thus, the aim of this study was to evaluate the cultivation of microalgae *Scenedesmus subspicatus* associated with nitrifying microorganisms, as forms of bioaugmentation using as a means of alternative cultivation of brewery wastewater. Through the physicochemical characterization of brewery wastewater and concentration tests evaluating the specific growth rates, determining the production of biomass and lipids. For the statistical design of the specific growth rates was adopted a factorial design with 2 factors and 2 levels and repetitions at one point, and biomass productivity and lipid content was adopted DIC with four treatments and five replications. Data were subjected to analysis of variance and F test and comparison of treatment means was performed by Tukey test ( $p < 0,05$ ). The highest specific growth rate was obtained by treatment with 100% brewery raw wastewater associated with nitrifying microorganisms,  $0.8427 \text{ d}^{-1}$ , which was adopted in subsequent treatments. For biomass productivity treatments 1, 2 and 3, through MC with microorganism through MC without microorganism and brewery wastewater with microorganism, respectively, showed no significant difference yielding  $0.4988$ ,  $0.4815$  and  $0.4023 \text{ g L}^{-1} \text{ week}^{-1}$ , respectively, higher than the 4 treatment, wastewater brewery, which produced  $0.1107 \text{ d}^{-1}$ , and the lipid content in treatments 4, 3, 1 and 2 showed significant difference producing 33.68, 22.81, 15.34 and 13.36%, respectively, with treatment being superior to the other 4 this may be associated with a stress condition caused by no ideal ratio of N sources, or a nutritional status was not appropriate. The microalga *Scenedesmus subspicatus* presented a biomass productivity of  $0.4023 \text{ g L}^{-1} \text{ week}^{-1}$  in treatment 3, with a lipid content of 22.81%, which can produce  $209,196 \text{ kg biomass ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ , or  $47,717.61 \text{ kg lipid ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$ .

**Key words:** Biofuels, bioaugmentation, lipids, brewery

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores codificados dos tratamentos utilizando água residuária de cervejaria associado ao Nite Out II .....	25
Tabela 2 – Valores codificados dos tratamentos utilizando água residuária de cervejaria associado a <i>Pseudonocardia nitrificans</i> .....	26
Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos analisados para a água residuária de cervejaria .....	29
Tabela 4 - Análise de variância da velocidade específica de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II. ....	34
Tabela 5 - Dados originais e codificados para determinação das velocidades específicas máximas (calculada) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de Nite Out II, conforme tratamento proposto. ....	35
Tabela 6 - Análise de variância da velocidade específica de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> . ....	41
Tabela 7 - Dados originais e codificados para determinação das velocidades específicas máximas (calculada) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> , conforme tratamento proposto. ....	42
Tabela 8 - Análise de variância da produtividade de biomassa da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada em meio MC e água residuária de cervejaria associados ou não a <i>Pseudonocardia nitrificans</i> . ....	45
Tabela 9 - Produtividade de biomassa da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada em diferentes meios de cultivo: meio MC com <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (tratamento 1), meio MC (tratamento 2), água residuária de cervejaria com <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (tratamento 3), água residuária de cervejaria (tratamento 4).....	45
Tabela 10 - Análise de variância do teor de lipídios da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada em meio MC e água residuária de cervejaria associados ou não a <i>Pseudonocardia nitrificans</i> . ....	46

Tabela 11 - Teor de lipídios da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> cultivada em diferentes meios de cultivo: meio MC com <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (tratamento 1), meio MC (tratamento 2), água residuária de cervejaria com <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (tratamento 3), água residuária de cervejaria (tratamento 4).....	47
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> .....	18
Figura 2 - Esquema de uso da câmara de Neubauer.....	22
Figura 3 – Procedimento de ajuste linear. O coeficiente angular da reta pode ser obtido facilmente, representando a velocidade específica de crescimento constante na fase exponencial.....	24
Figura 4 - Curvas de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II.....	30
Figura 5 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 100% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 01.....	31
Figura 6 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 100% água residuária de cervejaria + 1,00 mL de Nite Out II na fase exponencial do crescimento – experimento 02.....	31
Figura 7 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 2) na fase exponencial do crescimento – experimento 03..	32
Figura 8 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 1) na fase exponencial do crescimento – experimento 04..	32
Figura 9 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 25% água residuária de cervejaria + 1,00 mL de Nite Out II na fase exponencial do crescimento – experimento 05.....	33
Figura 10 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 25% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 06.....	33
Figura 11 - Gráfico de Pareto apresentando as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada a 5% de significância.....	34
Figura 12 - Superfície de resposta para velocidade de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> com diferentes concentrações de água residuária e diferentes concentrações de Nite Out II. ....	36

Figura 13 - Curvas de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> .....	37
Figura 14 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 100% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 01.....	38
Figura 15 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 100% água residuária de cervejaria + 1,00 ml de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> na fase exponencial do crescimento – experimento 02. ....	38
Figura 16 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 ml de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (repetição 2) na fase exponencial do crescimento – experimento 03. ....	39
Figura 17 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 ml de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> (repetição 1) na fase exponencial do crescimento – experimento 04. ....	39
Figura 18 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 25% água residuária de cervejaria + 1,00 ml de <i>Pseudonocardia nitrificans</i> na fase exponencial do crescimento – experimento 05. ....	40
Figura 19 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> em 25% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 06.....	40
Figura 20 - Gráfico de Pareto apresentando as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada a 5% de significância.....	41
Figura 21 - Superfície de resposta para velocidade de crescimento da microalga <i>Scenedesmus subspicatus</i> com diferentes concentrações de água residuária e diferentes concentrações da bactéria <i>Pseudonocardia nitrificans</i> .....	43

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Conama – Conselho nacional do meio ambiente  
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado  
DQO – Demanda Química de Oxigênio  
ETE - Estação de Tratamento de Efluente  
GEE – Gases de Efeito Estufa  
INAB – Indústria Nacional de Bebidas  
InPAA – Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental  
IPCC - International Panel on Climate Change  
pH – potencial Hidrognênico  
PI – Patente de Invenção  
PIB – Produto Interno Bruto  
RED – Renewable Energy Directive  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – graus Celsius  
a.C. – antes de Cristo  
C - Carbono  
g – grama  
H - Hidrogênio  
h – hora  
h dia<sup>-1</sup> – horas por dia  
H<sub>2</sub>O – água  
ha – hectare  
K – Potássio  
kg – kilograma  
L ano<sup>-1</sup> – litros por ano  
ln – logaritmo neperiano  
m – metro  
mg L<sup>-1</sup> – miligramas por litro  
mL – mililitro  
mL L<sup>-1</sup> – mililitros por litro  
mm – milímetro  
mm<sup>2</sup> – milímetro quadrado  
mol m<sup>-3</sup> – mol por metro cúbico  
N – Nitrogênio  
N – normalidade  
n° - número  
NaOH – hidróxido de sódio  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - íon amônio  
nm – nanômetro  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - íon nitrito  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - íon nitrato  
O - Oxigênio  
O<sub>2</sub> – gás oxigênio  
OH<sup>-</sup> - íon hidroxila

P – Fósforo

ppm – partes por milhão

t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> – tonelada por hectare por ano

[água residuária] – concentração da água residuária bruta de cervejaria em %

[mo] – quantidade de microrganismo em mL

## SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS .....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
<b>2.1 Problemática Ambiental .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Mudanças climáticas .....	3
2.1.2 Águas residuárias.....	4
2.1.3 Efluente de cervejaria.....	5
2.1.4 Legislação ambiental – Efluente .....	6
<b>2.2 Produção de Algas .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Meios de cultivo .....	7
2.2.2 Microrganismos nitrificantes.....	9
2.2.3 Bioaugmentação e bioestimulação .....	10
2.2.4 Algas.....	10
<b>2.3 Biocombustíveis .....</b>	<b>14</b>
2.3.1 RED (Renewable Energy Directive).....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
<b>3.1 Caracterização Físico-Química da Água Residuária de Cervejaria .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Nitrogênio amoniacal .....	18
3.1.2 Nitrito.....	19
3.1.3 Nitrato.....	19
3.1.4 Ortofosfato.....	20
3.1.6 Determinação do pH.....	20
<b>3.2 Meios de Cultivo .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 Meio MC.....	20

3.2.2 Meio alternativo: Água residuária de cervejaria .....	21
3.2.3 Microrganismos nitrificantes.....	21
<b>3.3 Avaliação do Cultivo da Microalga.....</b>	<b>21</b>
3.3.1 Concentração celular das microalgas .....	21
3.3.2 Determinação das velocidades de crescimento .....	22
3.3.3 Cultivo sem fotoperíodo .....	25
3.3.5 Produtividade de biomassa .....	27
3.3.6 Produtividade de lipídios .....	27
3.3.7 Delineamento experimental.....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Caracterização físico-química da água residuária de cervejaria.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Velocidades específicas de crescimento .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Produtividade de Biomassa .....</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Teor de Lipídios .....</b>	<b>46</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Após a revolução industrial, no final do século XVIII, e durante o século XX, os impactos das atividades humanas no meio ambiente tornaram-se muito significativos. A comunidade científica tem divulgado que o aumento da população e do consumo pessoal, principalmente nos países desenvolvidos, originou problemas ambientais cuja solução é o grande desafio para pesquisadores de todo o mundo.

Grande parte dos problemas ambientais está relacionado com a exploração e utilização de energia. Poluição, chuva ácida, destruição da camada de ozônio, aquecimento da terra por causa da intensificação do efeito estufa, destruição da fauna e da flora são alguns dos efeitos dos processos atualmente disponíveis para a geração de energia.

Para enfrentar o aumento da demanda por energia no futuro, é preciso encarar o uso da energia sob a ótica do consumo sustentável, ou seja, aquele que atende às necessidades da geração atual, sem prejuízo para gerações futuras. Isso significa eliminar desperdícios e buscar fontes alternativas mais eficientes e seguras para o homem e o meio ambiente. Como boa parte da tecnologia de produção contemporânea está baseada em derivados de petróleo, não é difícil observar as vantagens competitivas do Brasil, com sua imensa capacidade de produção de energia a partir de fontes perenes: sol, ventos, biomassa.

Neste cenário a produção vegetal é uma área de extrema importância, pois além de produzir biomassa para alimentação, também será responsável pela produção de biomassa para produção de biocombustíveis.

Porém, uma preocupação já constatada é a tendência de cultivos das fontes agrícolas de biomassa em regime de monoculturas e com o uso intensivo de agrotóxicos. A sustentabilidade do aproveitamento da biomassa na matriz energética brasileira passa, portanto, por medidas ambientalmente adequadas e socialmente justas no setor agrícola.

Neste contexto surgem as algas marinhas e continentais como alternativas promissoras na substituição das matérias-primas atualmente utilizadas, estas apresentam várias vantagens frente aos vegetais superiores como: alta eficiência fotossintética, alta velocidade de crescimento, alta produtividade de biomassa, etc. Podendo serem cultivadas em meios de culturas convencionais ou meios alternativos como águas residuárias, em sistemas fechados ou abertos, com maiores ou menores gastos de materiais e energia. Levando a expansão das grandes fronteiras agrícolas do futuro, partindo para a agricultura aquática, tanto marinha como continental.

Também as limitações impostas pela diretiva 2009/28/CE do parlamento europeu, a qual limita ou impede que matérias-primas utilizadas para alimentação sejam utilizadas para produção de biocombustíveis. Apontando para o futuro dos biocombustíveis de terceira geração, produzidos a partir de biomassa algal.

A indústria cervejeira no Brasil é um dos motivadores da economia em diversos municípios, daqueles que têm o cultivo da cevada como atividade principal, quanto daqueles onde está instalado as fábricas e os centros de distribuição. Além de contribuir significativamente com a economia do país, em torno de 1% do PIB, tendo a maior arrecadação de tributos entre os setores da economia com dedicação a bens de consumo, superando a fabricação de veículos e cigarros, a indústria brasileira de cerveja conquistou lugar de destaque no cenário internacional (SANTOS, 2005).

No processo produtivo da cerveja é gerada uma grande quantidade de resíduos, principalmente águas residuárias. A grande quantidade e a elevada carga orgânica destas águas residuárias faz com que este seguimento seja considerado pelos órgãos ambientais como sendo de alto potencial poluidor. O grande número de indústrias cervejeiras e o elevado volume de água residuária que estas produzem fazem com que este setor tenha de investir cada vez mais no sistema de tratamento de seus efluentes (SANTOS, 2005).

Segundo Santos (2005), em São Paulo são utilizados de 4 à 7 litros de água por litro de cerveja, podendo chegar a 10 litros, as águas residuárias são tratadas nas ETE que são compostas por um pré-tratamento, neutralização e equalização, e um sistema de tratamento biológico integrando etapas anaeróbia e aeróbia.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo de microalga *Scenedesmus subspicatus* associada com microrganismos nitrificantes utilizando como meio de cultivo alternativo água residuária de cervejaria. Através da caracterização físico-química da água residuária de cervejaria e testes de concentração avaliando-se as velocidades específicas de crescimento determinando-se a produção de biomassa e de lipídios.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Problemática Ambiental**

#### 2.1.1 Mudanças climáticas

A energia desempenha um papel fundamental em todas as atividades humanas, não sendo diferente no relacionado ao desenvolvimento sócio-econômico das últimas décadas, o qual necessitou de um grande aumento do consumo energético, baseado principalmente nos combustíveis fósseis (RUSSO, 2011). Segundo o mesmo autor, o aumento do consumo de petróleo a partir da década de 70, associado a elevação de seu preço, transformou a energia em um importante fator de desenvolvimento, passando a constituir uma problemática política e estratégica a nível mundial.

A gravidade dos impactos ambientais vai depender em grande parte da fonte de energia usada. O emprego de fontes não renováveis, como o petróleo, o gás natural, o carvão mineral e o potencial nuclear, estão associados a maiores riscos ambientais, tanto locais (poluição do ar) como globais (efeito estufa). As fontes de energia renováveis, como: a água, o sol, os ventos e a biomassa, são consideradas as formas de geração mais limpas que existem, embora também possam afetar o meio ambiente, dependendo das suas formas de utilização.

Segundo Macêdo (2000), desenvolvimento sustentável é o conjunto de esforços para obtenção de um ponto de equilíbrio entre a atividade produtiva e o respeito ao meio ambiente.

Segundo Buckeridge, Mortari e Machado (2008), as mudanças climáticas globais estão relacionadas ao aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera oriundo principalmente da queima de combustíveis fósseis.

O Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (International Panel on Climate Change - IPCC) concluiu, no seu terceiro relatório, que a temperatura média da atmosfera aumentou em  $0,6^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante o século XX (IPCC, 2001). Os modelos globais do IPCC apontam que entre 1900 e 2100 a temperatura global pode aumentar entre  $1,4^{\circ}\text{C}$  e  $5,8^{\circ}\text{C}$ , representando um aquecimento maior do que o observado para o século XX, o qual não possui precedentes durante os últimos 10.000 anos.

Este aumento da temperatura compromete a produção vegetal de maneira significativa, pois altera o período de floração das plantas, regimes e locais de chuvas, extinção de espécies

tanto vegetais como animais (insetos de interesse agrônômico), aumento da população de insetos praga, etc.

A elevação da concentração de gás carbônico na atmosfera é considerada uma das principais causas do aquecimento global. A fixação biológica através do cultivo de algas é uma alternativa promissora no sequestro deste, visto que paralelamente a captura do gás carbônico ocorre a produção de biomassa rica em compostos de valor comercial (JACOB-LOPES *et al.*, 2009).

No campo da produção de energia da biomassa, o Brasil é um país absolutamente privilegiado (CENBIO, 2012). Por dispor da incidência da energia solar durante todo o ano, em quase toda a sua extensão territorial, pode se propor a implantar um amplo programa de geração de energia de variadas fontes alternativas como: biodiesel gerado a partir de gorduras e/ou óleos de origem vegetal e/ou animal, álcool de cana-de-açúcar, biogás de dejetos e restos de produção, etc. (VASCONCELLOS, 2002).

### 2.1.2 Águas residuárias

Segundo a Política Nacional de Recursos Hídricos, lei 9.433 de 8 de janeiro de 1997, a água é um bem de domínio público, recurso natural limitado e dotado de valor econômico.

A água é uma substância muito utilizada nas indústrias em geral, não sendo diferente nas agroindústrias, nas quais desempenha vários papéis, desde transporte de energia (vapor), refrigeração, controle de umidade, vedação de equipamentos, não comprometendo de maneira significativa sua qualidade. Porém em alguns usos como lavagem de matérias-primas, equipamentos, pisos e paredes, higiene pessoal e de roupas e também no processamento destas matérias-primas, a água acaba incorporando outras substâncias alterando significativamente sua qualidade.

Esgoto é o termo usado para caracterizar os dejetos provenientes dos diversos usos das águas, tais como doméstico, comercial, industrial, agrícola, estabelecimentos públicos, infiltração de água na rede de esgotos, etc. (UEHARA, 1989).

A água utilizada na indústria e que tem a suas características alteradas são denominadas de esgoto industrial, efluente líquido, águas servidas, usadas ou residuárias. Dependendo do tipo de indústria, ela possui características específicas, não podendo ser lançadas no meio ambiente sem o devido tratamento prévio, o qual tem a função de remover

tais contaminantes e poluentes, conferindo características próximas a inicial ou conforme determinação legal.

Atualmente grande parte das pesquisas são relacionadas ao tratamento de efluentes, com vistas a diminuição dos impactos ambientais sobre os recursos hídricos.

As águas residuárias devido ao seu alto conteúdo de nutrientes, nitrogênio e fósforo, constituem um meio apropriado para o crescimento de microalgas, as quais tem demonstrado sua capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo para seu crescimento (KWANG-YONG; CHOUL-GYUN, 2002).

### 2.1.3 Efluente de cervejaria

Segundo Rebello (2009), a cerveja é uma das bebidas mais antigas do mundo, os primeiros indícios datam de 8.000 a. C. na Palestina. A Lei que regulamenta a fabricação de cerveja no Brasil é a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, regulamentada pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, a qual em seu artigo 64 define cerveja como: bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo.

Segundo Iannicelli (2008), o processo de fabricação da cerveja é composto pelas seguintes fases: malteação – processo de germinação e eliminação do crescimento da cevada; armazenamento – armazenamento do malte; moagem – processo de moer o malte; preparação do mosto – cozimento do malte; filtração inicial – filtração do mosto em filtro prensa ou cuba filtro; lupalagem – adição de lúpulo; xarope de maltose – adição de xarope de maltose; fervura – fervura do mosto; decantador – decantação do mosto; resfriador – resfriamento do mosto; fermentação – adição de levedura para fermentação; maturação – período de produção de gás carbônico e estabilização da cerveja; filtração final – filtração final para diluição e incorporação de gás carbônico; adega – armazenamento da cerveja pronta para envasar, e envazamento – processo de enchimento da cerveja nas embalagens. Em diversas destas fases são geradas águas residuárias do próprio processo ou da limpeza dos equipamentos.

O Brasil em 2007 era o quinto maior produtor mundial de cerveja com produção de 8,5 bilhões de L ano<sup>-1</sup> perdendo para a China com 27,0 bilhões de L ano<sup>-1</sup>, Estados Unidos com 23,6 bilhões de L ano<sup>-1</sup>, Alemanha com 10,5 bilhões de L ano<sup>-1</sup> e Rússia com 9,0 bilhões de L ano<sup>-1</sup> (SINDICERV, 2007). Segundo Sobral (2012), em 2011 o Brasil passou a terceiro

maior produtor mundial de cerveja com 13,3 bilhões de L ano<sup>-1</sup>, porém é o décimo quinto em consumo com apenas 62 litros por pessoa por ano contra 143 litros por pessoa por ano da Republica Tcheca, primeira colocada em consumo, em produção só perde para a China com 48,9 bilhões de L ano<sup>-1</sup> e os Estados Unidos com 22,5 bilhões de L ano<sup>-1</sup>.

A qualidade e quantidade destas águas residuárias podem variar significativamente dependendo dos processos que ocorrem dentro da cervejaria, sendo composto basicamente de açúcares, amido solúvel, etanol, ácidos voláteis, etc. todas formas orgânicas que são facilmente biodegradáveis (IANNCELLI, 2008). Por exemplo, a lavagem de garrafas gera grandes volumes de efluente, mas com reduzida carga orgânica, porém, a fermentação e filtragem geram apenas 3% do volume de efluentes, mas são responsáveis por 97% da carga orgânica total (GUERREIRO, 2006).

Kochenborger (2012), caracterizando efluente bruto de cervejaria utilizado na limpeza dos equipamentos chegou aos seguintes resultados: DQO 2.156 mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>; DBO<sub>5</sub> 1.388 mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>; fósforo total 7,66 mg l<sup>-1</sup>; óleos e graxas 45,6 mg L<sup>-1</sup>; nitrogênio total 24,32 mg L<sup>-1</sup>; sólidos suspensos 443 mg L<sup>-1</sup> e pH 5,02.

Segundo Santos (2005), a indústria cervejeira caracteriza-se como grande consumidor de água, e em função das suas operações de fermentação e limpeza de equipamentos também é grande a quantidade de água residuária geradas com valores de DBO 1.200 à 3.000 mg L<sup>-1</sup> e sólidos suspensos de 100 à 800 mg L<sup>-1</sup>, sendo estes considerados altos. E volumes entre 3 à 6 litros de água residuária por litro de cerveja produzida, podendo chegar a 9.

#### 2.1.4 Legislação ambiental – Efluente

A resolução n° 430 de 13 de maio de 2011 do Conama, que altera e complementa a resolução n° 357 de 17 de março de 2005 do Conama, dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Em seu artigo 16 define as condições e padrões para lançamento de efluentes diretamente no corpo receptor sendo:

I - condições de lançamento de efluentes:

a) pH entre 5 a 9;

b) temperatura: inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura;

c) materiais sedimentáveis: até 1 mL L<sup>-1</sup> em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;

d) regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vez a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;

e) óleos e graxas:

1. óleos minerais: até 20 mg L<sup>-1</sup>;

2. óleos vegetais e gorduras animais: até 50 mg L<sup>-1</sup>;

f) ausência de materiais flutuantes; e

g) Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C): remoção mínima de 60% de DBO sendo que este limite só poderá ser reduzido no caso de existência de estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor;

II - Padrões de lançamento de efluentes:

Nitrogênio amoniacal total 20,0 mg L<sup>-1</sup> N, além de vários outros parâmetros inorgânicos e orgânicos.

Estes parâmetros devem ser atendidos pelas indústrias para poderem lançar seus efluentes no corpo receptor, além de outros estabelecidos pelos órgãos ambientais estaduais e/ou municipais.

## **2.2 Produção de Algas**

### **2.2.1 Meios de cultivo**

Os meios de cultivo artificiais foram criados na tentativa de simular o meio natural onde aquela alga ocorria. Definidos como meios convencionais, pois foram bem sucedidos, proporcionando os elementos essenciais ao desenvolvimento de uma determinada espécie de alga. Os meios artificiais podem ser completamente sintéticos, águas naturais enriquecidas com nutrientes ou águas residuárias, esta última apresentando como vantagens um baixo custo e uma alta disponibilidade (RUSSO, 2011).

Segundo Miyawaki (2010), os meios de cultivo utilizados podem alterar de forma significativa a taxa de crescimento e a composição da biomassa de microalga, e demandam investimentos altos relacionados aos nutrientes utilizados. Para manter grandes concentrações de algas no cultivo se faz necessário a adição de sais inorgânicos os quais impactam no custo deste.

Para diminuir estes problemas os meios de cultivo artificiais foram substituídos por fertilizantes utilizados na agricultura tradicional com formulações N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O, os quais também apresentam um custo significativo.

Nos últimos anos a tendência é o uso de águas residuárias para substituir estas fontes de nutrientes a um custo zero, inclusive trazendo vantagens ambientais, pois promovem a remoção destes nutrientes da água residuária, promovendo a fitorremediação, reduzindo assim o consumo de fertilizante mineral (recurso não renovável).

Segundo Cruz *et al.* (2006), o nitrogênio é um importante elemento para o metabolismo das plantas, pois contribui para a formação das proteínas e clorofilas. Porém a redução na sua quantidade pode reduzir o crescimento das algas, entretanto, ocorre um aumento na quantidade de lipídios produzidos (MIYAWAKA, 2010).

O nitrogênio pode ser proveniente de várias fontes como uréia, amônia ou íon amônio (formas dependentes do pH do meio), nitritos e nitratos.

Segundo Becker (1995), o pH do meio de cultivo é um dos parâmetros mais importantes no cultivo de algas, pois determina a solubilidade do gás carbônico e outros minerais no meio influenciando o metabolismo das algas.

Além da quantidade de nitrogênio no meio, outro fator que pode alterar o crescimento das plantas é a relação nitrato e íon amônio presente. Em estudo com mandioca submetida a várias proporções de nitrato e íon amônio Cruz *et al.* (2006) observaram que esta apresenta melhor desempenho em proporções de 9:3 e 6:6 mol m<sup>-3</sup>.

Segundo Russo (2011), também as relações nitrogênio fósforo (N:P) são importantes nos meios de cultivo influenciando na produtividade e na ocorrência de uma dada espécie, sendo a relação considerada ótima 16:1, através da qual pode ser determinado o nutriente limitante do cultivo. Outro parâmetro importante é a disponibilidade de luz e distribuição desta no meio de cultivo, o qual pode ser minimizado por ação mecânica de pás, bombas ou injeção de ar (aeração), as quais promovem uma mistura do meio.

O meio MC, descrito por Watanabe (1960), para o gênero *Scenedesmus* é um dos meios convencionais para esta microalga, sendo constituído de 1,250 g de nitrato de potássio, 1,250 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,020 g de sulfato de ferro II heptahidratado,

1,000 g de uréia, juntou-se também 1,00 ml da solução cinco, dissolvidos em um litro de água destilada. A solução cinco contém 2,900 g de ácido bórico, 1,810 g de cloreto de manganês tetrahidratado, 0,110 g de cloreto de zinco, 0,08 g de sulfato de cobre heptahidratado 0,018 g de molibdato de amônio tetrahidratado, os quais também são dissolvidos em um litro de água destilada.

### 2.2.2 Microrganismos nitrificantes

As microalgas estão associadas a outros microrganismos como bactérias de maneira simbiótica, fornecendo oxigênio e melhorando a atividade biológica destes, os quais utilizam o oxigênio para biodegradação aeróbia dos compostos orgânicos que são transformados em gás carbônico e então assimilados pelas microalgas (RUSSO, 2011).

A nitrificação biológica é o fenômeno no qual as formas de nitrogênio orgânico e amoniacal são transformadas a nitritos e posteriormente a nitratos, num processo de oxidação. Esta ocorre em duas fases: nitrosação e nitração.

Na fase de nitrosação o nitrogênio orgânico e amoniacal é oxidado a nitrito principalmente por bactérias nitrosas do gênero *Nitrosomonas* e *Nitrosococcus* segundo a equação 1.



Na fase de nitração o nitrito é oxidado a nitrato principalmente por bactérias nítricas do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira*, conforme equação 2.



Também bactérias do gênero *Pseudonocardia* são capazes de realizar a nitrificação biológica dos compostos de nitrogênio.

As bactérias actinobactérias (*Pseudonocardia*) são encontradas em associação simbiótica com formigas cultivadoras de fungos protegendo-o de outro fungo parasita (*Escovopsis*) que ameaçam os ninhos, esta proteção é obtida pela produção de substâncias antibióticas pela bactéria (POULSEN *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2011), obtiveram quatro compostos, três derivados e um sintetizado, a partir de um isolado de *Pseudonocardia* sp. obtida de sedimentos do mar da China, dos quais três apresentaram efeito citotóxico contra células tumorais e atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*.

### 2.2.3 Bioaugmentação e bioestimulação

Segundo Lazzaretti, Campos e Nogueira (2000), as primeiras tentativas de uso de microrganismos auxiliares no tratamento de resíduos foi no processo de digestão anaeróbia, na década de setenta foram desenvolvidos produtos com o objetivo de melhorar a eficiência dos sistemas de tratamento de efluentes denominado de bioaumentação.

Bioaugmentação é definida como a suplementação de microrganismos externos de ocorrência natural, tais como bolores e leveduras, e principalmente bactérias na unidade de tratamento biológico (MACÊDO, 2000).

Nos meios artificiais técnicas de bioaugmentação, bioestimulação e a combinação das duas podem ser utilizadas para manterem as relações entre algas e microrganismos ideais, a bioestimulação baseada no aumento da atividade microbiana nativa pela adição de nutrientes e a bioaugmentação baseada na adição de linhagens microbianas exógenas (RAIMUNDO; RIZZO; TRINDADE, 2003). Estes autores encontraram um melhor resultado da relação C:N:P (Carbono:Nitrogênio:Fósforo) para a nutrição dos microrganismos (*Nocardia nova*) na condição 100:1,25:1 para remover hidrocarbonetos de solo contaminado.

Nestes processos é necessário um determinado período para obtenção dos resultados em função das bactérias e enzimas adicionados que trabalham em simbiose atingirem um ponto de equilíbrio com os microrganismos já existentes (ROSA, 1995).

### 2.2.4 Algas

O termo alga foi primeiramente proposto como uma categoria taxonômica em 1753, por Lineu no seu clássico *Species plantarum*.

Segundo Bicudo e Menezes (2006), a melhor caracterização para as algas são os talófitos e protistas clorofilados, alguns inclusive seus parentes não pigmentados, cujos órgãos de reprodução jamais são envoltos por um conjunto ou tecido constituído de células estéreis.

Vários autores classificam as algas em seis grupos que se diferenciam pela coloração e substâncias de reserva, sendo: *Cyanophyta* – algas azuis; *Clorophyta* - algas verdes, amido e sacarose; *Euglenophyta* – euglenoides, paramilo; *Rodophyta* – algas vermelhas, amido; *Chrysophyta* – algas douradas, diatomáceas, crisolaminarina, lipídios, e *Phaeophyta* – algas marrons, laminarina e lipídios (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

As algas como outras plantas necessitam de quatro componentes básicos para seu desenvolvimento, sendo: luz com fotoperíodo claro de no mínimo 10 h dia<sup>-1</sup>, temperatura de 20°C, gás carbônico e água (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005). E seu crescimento responde a interação mútua destes fatores com vários outros como: nutrientes, pH, salinidade, aeração, etc.

As algas são organismos autotróficos, produzem a energia necessária ao seu metabolismo através da fotossíntese, contendo clorofilas a, b e c, são importantes na produção de oxigênio nos corpos de água e em alguns tratamentos de esgotos, mas podem proliferar em excesso, causando deterioração da qualidade da água. A clorofila a é responsável pelo primeiro estágio da fotossíntese através da transferência de elétrons e a clorofila b juntamente com os carotenoides e ficobilinas auxiliam na absorção da luz e na transferência de energia para os tilacóides, centros de reação (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Por serem fotossintetizantes, através da clorofila, elas tem a capacidade de absorver a energia da luz solar e converte-la em calor e energia química, transformando desta maneira gás carbônico em metabólicos essenciais. Segundo Carlsson *et al.* (2007), o mecanismo fotossintetizante das algas é comparável ao das plantas terrestres, porém devido a sua estrutura celular ser mais simples associado ao meio líquido que a maioria ocorre, são mais eficientes na absorção de gás carbônico e nutrientes do que as plantas superiores, tendo uma maior produtividade em biomassa. As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e são excelentes fixadoras de gás carbônico (BROWN; ZEILER, 1993).

Segundo Grima *et al.* (1999), a luz utilizada pelas algas situa-se entre 400 a 700 nm sendo designada por radiação fotossintética ativa, a qual corresponde a uma parte da energia fornecida pelo sol sendo dependente da latitude, horário, época do ano e clima.

Os termos micro e macro não apresentam significado taxonômico, somente estão associados ao tamanho da alga.

São eucariotas, pois possuem o núcleo das células confinado por uma membrana celular, como nas plantas superiores constituída de celulose, e apresentam um maior nível de diferenciação interna que os microrganismos procariotas. Em algumas classificações pertencem ao reino protista por não apresentarem alto nível de diferenciação celular, porém algumas macroalgas marinhas, as quais podem atingir vários metros de comprimento, apresentam alta diferenciação possuindo inclusive vasos condutores. Segundo Guiry e Guiry (2013), em seu material básico para taxonomia de algas, estas são classificadas no reino *Plantae*.

Normalmente se multiplicam pela simples divisão da célula, reprodução assexual, ou por fragmentação, ou ainda por reprodução sexual (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Nos sistemas de tratamento de efluentes, além de produzirem oxigênio, também removem nutrientes como nitrogênio, fósforo e carbono para satisfazerem suas próprias necessidades nutricionais (UEHARA, 1989). Segundo Dinis, Monteiro e Boaventura (2004), as microalgas também podem adsorver contaminantes como metais pesados, íons positivos, em sua superfície carregada negativamente.

Muitas algas preferem o nitrogênio na forma de íon amônio, por ser este rapidamente sintetizado em aminoácidos, ou então na forma de nitratos, produzindo 1,6 kg e 2,0 kg de oxigênio, respectivamente, para cada 1 kg de algas em peso seco (ARCEIVALA, 1981).

No trabalho de Oswald (1988), a partir de dados experimentais foi possível determinar a estequiometria para o material celular das algas, as quais apresentaram um percentual de carbono de 52,4, hidrogênio 7,4, oxigênio 29,7, nitrogênio 9,2 e fósforo 1,3 em cinzas base seco, respectivamente. Resultando na seguinte fórmula  $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ , a qual pode ser utilizada para determinar a quantidade de nutrientes removida pelas algas.

Também consomem gás carbônico das lagoas, subproduto da respiração das bactérias saprófitas e dos bicarbonatos do próprio meio líquido, modificando o equilíbrio carbonato-bicarbonato e, em consequência da formação de íons  $OH^-$ , eleva o pH do líquido, cujos valores variam de 8 a 11. Quando há uma elevação do pH acima destes valores, ocorre uma redução do número de bactérias, precipitação dos fosfatos de cálcio e perda parcial da amônia para a atmosfera. Portanto, em culturas com pH ácido ocorre uma maior disponibilidade de gás carbônico, sendo este, a fonte de carbono utilizada pelas microalgas (UEHARA, 1989), também de nitrogênio na forma de íon amônio, que é a forma predominante do nitrogênio amoniacal em pH ácido.

A aeração artificial além de ser fonte de gás carbônico também serve para homogeneizar os cultivos mantendo as algas em suspensão distribuindo desta maneira os nutrientes no meio e expondo todas as células a fonte de luz (UFSC, 2010).

As microalgas já estão sendo estudadas para remoção de gás carbônico proveniente da queima de combustíveis fósseis nas indústrias, para cada 100 toneladas de alga são fixados 183 toneladas de gás carbônico, sem custos para este componente (CHISTI, 2007; MORAIS; COSTA, 2008)

Nas lagoas de estabilização as algas são responsáveis pelos maiores problemas destas instalações, pois contribuem significativamente para o aumento dos sólidos em suspensão.

As algas que mais ocorrem em lagoas de estabilização são as algas verdes as quais indicam uma boa condição de funcionamento, pH elevado e um meio líquido balanceado em nutrientes, e as algas azuis unicelulares, coloniais ou filamentosas sendo menos eficientes na produção de oxigênio, ocorrem em pH neutro ou alcalino, em temperaturas mais elevadas e onde ocorre uma deficiência ou desequilíbrio de nutrientes como nitrogênio, por possuírem vacúolos de gás em suas células, estas flutuam na superfície da lagoa dificultando a penetração da luz solar no líquido.

Segundo Seeliger e Cordazzo (1980), estudos ecológicos executados *in situ*, muitas vezes não representam as relações entre algas e um parâmetro ambiental, fazendo-se necessários estudos experimentais em laboratório, os quais variando-se um parâmetro pode-se avaliar a resposta a esta variação, o que é necessário para conhecer a ecologia básica daquela espécie.

O interesse pelo cultivo de algas vem crescendo mundialmente nos últimos anos, principalmente em relação aos aspectos econômicos usando a biomassa para a produção de alimentos ou produtos biotecnológicos, também com relação aos aspectos ambientais dentre os quais podem ser destacados a fitorremediação, pela remoção de nutrientes, metais pesados e outras substâncias, sequestro de gás carbônico, produção de oxigênio, bioindicadores, etc.

As microalgas apresentam elevada produtividade em biomassa, necessitando de menor área para seu cultivo, respectivamente um menor custo (TEIXEIRA; MORALES, 2006), e o solo pode ser degradado, pois serve somente como meio suporte para o cultivo. A produção de biomassa é contínua, não seguindo regimes de safras. O meio de cultivo pode ser reaproveitado e como fontes de carbono podem ser utilizados o gás carbônico residual de processos (BENEMANN, 1997; MORAIS; COSTA, 2008) e fontes orgânicas residuais (VICHEZ *et al.*, 1997).

Segundo Carlsson *et al.* (2007), algumas algas produzem amido como substância de reserva o qual pode ser transformado em álcool combustível, outras produzem lipídios como substância de reserva que pode ser transformado em biodiesel e algumas podem produzir hidrogênio que também pode ser utilizado como combustível.

Por apresentar em alguns casos ciclo de vida em torno de 6 h, tornando-se desta maneira um dos organismos mais eficientes na produção de biomassa, se comparado com plantas superiores.

A obtenção do conteúdo lipídico pode ser conseguida pela simples extração mecânica em prensas, extração com solventes químicos ou associação de ambos.

Existem vários estudos comparando o conteúdo e a produtividade de lipídios das microalgas com relação a vegetais superiores. Pérez (2007), comparando a produção de biodiesel de microalgas produzidas em lagoas abertas levantou um potencial de 50 a 150 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> contra 0,2 a 0,6 t ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> para a soja, resultando num aumento de 83 a 750 vezes.

No trabalho de Chisti (2007), é relatado que o conteúdo de lipídios nas microalgas podem ultrapassar 80% do seu peso seco, sendo mais comum se situarem entre 20% e 50%, quando comparado com a produtividade de óleo da soja, a qual produz 446 L ha<sup>-1</sup>, as microalgas com 70% de lipídios produzem 136.900 L ha<sup>-1</sup>, e microalgas com 30% de lipídios produzem 58.700 L ha<sup>-1</sup>, resultando num aumento de 307 e 131 vezes, respectivamente.

O crescimento celular pode ser definido como o aumento ordenado de todos os componentes metabólicos, na análise cinética das reações biológicas é importante quantificar taxas e quocientes metabólicos tais como: tempo de duplicação, taxas volumétricas, taxas específicas de consumo de substrato, quociente metabólico de consumo de nutrientes por biomassa, taxa de remoção de nutrientes e taxa específica de crescimento, proporcionando uma análise destas dinâmicas (RUSSO, 2011).

O número exato de espécies de algas ainda não é conhecido, possivelmente entre 200.000 a 1.000.000 de espécies.

A microalga *Scenedesmus* pertence a divisão *Chlorophyta*, classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales*, família *Scenedesmus*, podendo ser encontrada solitária ou em pares formando cenóbios (VILLASMIL, 2004). Segundo Bicudo e Menezes (2006), o gênero *Scenedesmus* são indivíduos coloniais com dois, quatro, oito, dezesseis e até trinta e duas células dentro do cenóbio, é o mais comum dentre as algas verdes e vivem flutuando nas águas.

### 2.3 Biocombustíveis

Os biocombustíveis de primeira geração tem como matéria-prima o açúcar, o amido e os óleos e/ou gorduras vegetais e/ou animais, os quais concorrem diretamente com a produção de alimentos, a segunda geração tem como matéria-prima culturas não destinadas a alimentação e resíduos, a terceira geração baseia-se na produção de microalgas como matéria-prima (RUSSO, 2011).

Biodiesel é uma denominação genérica de combustíveis para motores de combustão interna com ignição por compressão (ciclo diesel), derivados de fontes renováveis, como

óleos de dendê, soja, palma, mamona, etc. O Brasil foi pioneiro em pesquisas sobre biodiesel com os trabalhos do professor Expedito José de Sá Parente, da Universidade Federal do Ceará, o qual é autor da patente PI – 8007957. A primeira patente, brasileira, do biodiesel, já de domínio público (PARENTE, 2003).

Os óleos e gorduras vegetais ou animais são triacilglicéris, produtos naturais da reação do 1,2,3-propanotriol (glicerol) com ácidos graxos, cujas cadeias têm números de carbonos que variam de 12 a 22 e tem peso molecular 3 vezes maior que o diesel. A transesterificação provoca a quebra das moléculas dos triacilglicéris, em presença de álcool e catalisador, gerando uma mistura de ésteres dos ácidos graxos correspondentes, liberando o glicerol, substância que forma goma e provocaria a carbonização do motor, como subproduto da reação, sendo o peso molecular e também as propriedades físico-químicas desses monoésteres próximas as do diesel.

Segundo PARENTE (2003), o que tem sido denominado de biodiesel, é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, sucedâneo ao óleo diesel, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, respectivamente.

A grande vantagem do biodiesel é o seu uso direto em motores ciclo diesel com pouca ou sem nenhuma adaptação. Muitas das montadoras mantêm a garantia para motores que usem misturas com até 5% de biodiesel, pois nessa porcentagem é considerado um aditivo, melhorando inclusive o poder de lubrificação que o óleo diesel deve apresentar e que lhe é conferido pelo enxofre, o qual atualmente foi diminuído significativamente, passando de 2.000 ppm à 10 ppm (S10).

Para a bioquímica os lipídios encontrados nas algas possuem características físico-químicas semelhantes aos encontrados em outros vegetais, podendo assim ser consideradas matérias-primas para a produção de biodiesel.

Segundo Chisti (2007), a maior parte dos lipídios encontrado nas microalgas está na forma de triacilglicéris, os que servem para produção de biodiesel, sendo que a biomassa de algas apresenta principalmente carboidratos, proteínas e lipídios.

Rosales *et al.* (2010), em cultivos de cepas de *Scenedesmus obliquus* em erlenmeyers a 25°C sob aeração constante utilizando o meio de cultivo BGN obtiveram 9% de lipídios.

Em estudos realizados com microalgas verdes, tendo 17% de lipídios, quando submetidas a ausência de nitrogênio durante um período de 4 a 9 dias, tiveram um aumento de 2 a 3 vezes seu conteúdo lipídico (MIYAWAKI, 2010).

Nos últimos anos as microalgas tem sido consideradas como importante alternativa para substituir as fontes tradicionais de matérias-primas, oleaginosas, para produção de biodiesel no Brasil e no mundo pois superam muitos vegetais terrestres em produtividade e quantidade de lipídios, apresentando um crescimento mais rápido e um maior rendimento em biomassa (MIYAWAKI, 2010).

Segundo Dimitrov (2007), o biodiesel de algas ainda é inviável devido ao seu alto custo, porém, este pode ser diminuído em função dos trabalhos para selecionar espécies de microalgas com elevado teor de lipídios, um melhor entendimento da sua fisiologia e na melhoria das tecnologias dos cultivos.

Segundo Leal e Leal (2007), a necessidade de redução do uso e dependência de combustíveis de origem fóssil, controle da quantidade de gases de efeito estufa (GEE) lançados na atmosfera são os principais elementos para desencadear a substituição destes por fontes alternativas como os biocombustíveis.

### 2.3.1 RED (Renewable Energy Directive)

A diretiva 2009/28/CE do parlamento europeu e do conselho de 23 de abril de 2009, relativa a promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as diretivas 2001/77/CE e 2003/30/CE, conhecida também pela sigla RED (Renewable Energy Directive), traz várias definições e sistemas de certificação para que biocombustíveis sejam utilizados dentro da comunidade europeia, tendo como principais metas o uso de 20% de energia proveniente de fontes renováveis do total global e 10% para a energia proveniente de fontes renováveis nos transportes até 2020, também uma melhoria da eficiência energética de 20% até 2020.

Segundo a diretiva 2009/28/CE os biocombustíveis só serão elegíveis de incentivos quando for possível garantir que não provêm de zonas ricas em biodiversidade ou, no caso de zonas designadas para fins de proteção da natureza ou para a prospecção de espécies ou ecossistemas raros ameaçados ou em risco de extinção, que a autoridade competente apresente provas de que a produção de matérias-primas não afeta esses fins.

Esta diretiva prejudica a comercialização de soja brasileira para a comunidade europeia, pois a maior parte dos grãos esmagados são destinados para a produção de biodiesel, e no anexo V – Regras para o cálculo do impacto dos biocombustíveis, outros biolíquidos e dos combustíveis fósseis de referência na formação de gases com efeito estufa –

o biodiesel produzido a partir do óleo de soja reduz somente 31% os gases do efeito estufa (GEE) em relação aos combustíveis fósseis, sendo o que mais impactou neste valor foram as emissões de gases de efeito estufa por defeitos discriminado para o processamento (incluindo eletricidade excedente) o qual apresentou o segundo maior valor para as matérias-primas para biodiesel, emissão de gases de efeito estufa por defeitos discriminados para o transporte e distribuição no qual a soja superou todas as outras matérias-primas inclusive para a produção de álcool e biogás.

As certificações serão atribuídas aos biocombustíveis que reduzirem pelo menos 35% das emissões de gases de efeito estufa comparado aos combustíveis fósseis, esta proporção vai aumentar para 50% em 2017 e 60% em 2018.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus*, Figura 1, foi realizado no Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) no laboratório de Ficologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE - *Campus* Toledo, o qual forneceu a cepa da microalga. O meio alternativo, água residuária de cervejaria, foi cedida pela Indústria Nacional de Bebidas (INAB), também situada em Toledo. As análises físico-químicas para caracterização da água residuária, determinação da biomassa produzida e teor de lipídios das amostras foram realizados no laboratório de química orgânica da Universidade Federal do Paraná – UFPR – Setor Palotina.

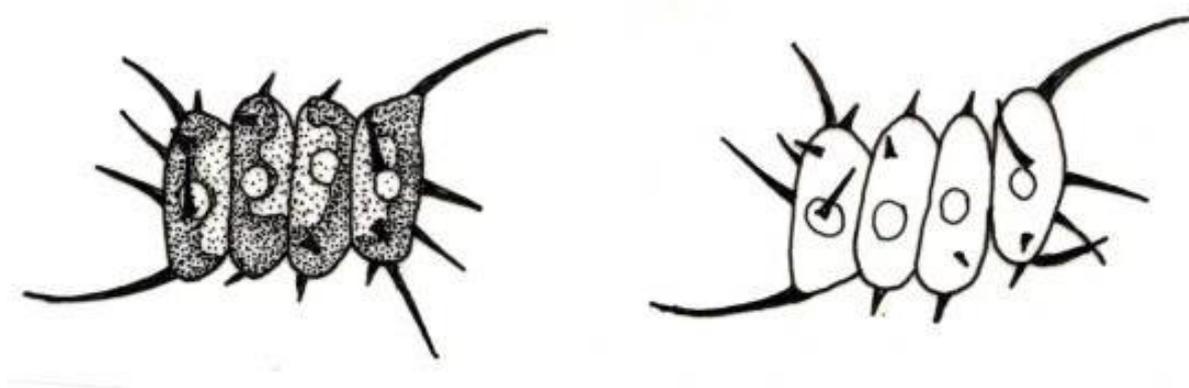


Figura 1 - Microalga *Scenedesmus subspicatus*  
Fonte: Algoteca de Coimbra – ACOI (2013)

#### 3.1 Caracterização Físico-Química da Água Residuária de Cervejaria

##### 3.1.1 Nitrogênio amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada conforme Standard Methods (1998).

Para cada amostra pipetou-se 35,00 mL. Adicionou-se 1,00 mL de citrato de sódio e agitou-se, após adicionou-se 1,00 mL fenol e agitou-se. Também adicionou-se 1,00 mL hipoclorito diluída e agitou-se. Foi deixado em repouso no mínimo por 3 horas em lugar escuro. A leitura foi realizada a 630 nm num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo

EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. Relacionou-se a concentração da amostra com a curva padrão previamente estabelecida.

### 3.1.2 Nitrito

A concentração de nitrito foi determinada conforme Standard Methods (1998).

Para cada amostra de água, incluindo diluições padrões, pipetou-se 5,00 mL em tubo de ensaio, com réplica. Adicionou-se 0,10 mL de sulfanilamida sob agitação e aguardou-se de 2 a 10 minutos. Adicionou-se 0,10 mL de naftil sob agitação. A leitura foi realizada no intervalo entre 20 a 30 minutos à 540 nm num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. Relacionou-se a concentração da amostra com a curva padrão.

### 3.1.3 Nitrato

A concentração de nitrato foi determinada conforme Standard Methods (1998).

Os íons nitratos presentes na amostra foram reduzidos a nitrito na presença de cádmio amalgamado, tornando possível a sua determinação.

Foram colocados 10,00 mL das amostras de água em frascos plásticos, incluindo padrões, adicionou-se 0,600 g de cádmio amalgamado e 0,10 mL de cloreto de amônia concentrado (3 molar), agitando por 20 minutos, para redução do íon nitrato a nitrito, e utilizou-se o sobrenadante como amostra. Para cada amostra de água, incluindo diluições padrões, pipetou-se 5,00 mL em tubo de ensaio, com réplica. Adicionando 0,10 mL de sulfanilamida, sob agitação aguardando por 2 a 10 minutos. Adicionou-se 0,10 mL de naftil e agitou. A leitura foi realizada no intervalo de 20 a 30 minutos a 540 nm, num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. Relacionou-se a concentração da amostra com a curva padrão.

### 3.1.4 Ortofosfato

A concentração de ortofosfato foi determinada conforme Standard Methods (1998).

Foram colocados 30,00 mL da amostra de água em um recipiente, após adicionou-se 3,00 mL de reagente misto sob agitação. Foi deixado em repouso 30 minutos, e após feita a leitura a 882 nm, num espectrofotômetro digital marca Edutec modelo EEQ-9029. Utilizou-se água destilada pura como branco. Relacionou-se a concentração da amostra com a curva padrão.

### 3.1.6 Determinação do pH

O pH foi determinado através de pHmetro, sendo calibrado conforme instruções do fabricante antes das medições. As medições foram feitas através da imersão direta do eletrodo nos recipientes de cultivo.

## **3.2 Meios de Cultivo**

### 3.2.1 Meio MC

Com o auxílio de uma balança digital de precisão foram pesados 1,250 g de nitrato de potássio, 1,250 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,020 g de sulfato de ferro II heptahidratado, 1,000 g de uréia, juntou-se também 1,00 mL da solução cinco, os quais foram dissolvidos em um litro de água destilada. A solução cinco foi preparada pesando-se 2,900 g de ácido bórico, 1,810 g de cloreto de manganês tetra hidratado, 0,110 g de cloreto de zinco, 0,08 g de sulfato de cobre heptahidratado 0,018 g de molibdato de amônio tetra hidratado, os quais também foram dissolvidos em um litro de água destilada (WATANABE, 1960).

### 3.2.2 Meio alternativo: Água residuária de cervejaria

A água residuária de cervejaria foi coletada antes do sistema de tratamento de efluentes em dia de produção com todas as etapas sendo realizadas, sendo posteriormente autoclavada a 120°C durante 20 min e após resfriada a temperatura ambiente.

### 3.2.3 Microrganismos nitrificantes

Os microrganismos nitrificantes utilizados no experimento foram dois, sendo um deles um produto comercial, pool de bactérias nitrificantes, composto por *nitrosomonas*, *nitrobacter* e *nitrospira* denominado de Nite Out II produzido pela Ecological Laboratories, Inc, e o outro uma cepa de *pseudonocardia nitrificans* F7548 fornecido pela Agricultural Research Service (ARS) culture collection (NRLL) do United States Departamento of Agriculture (USDA), ambos com origem nos Estados Unidos da América e com concentração celular de  $3.10^3$  células mL<sup>-1</sup>.

## 3.3 Avaliação do Cultivo da Microalga

### 3.3.1 Concentração celular das microalgas

A concentração celular das microalgas foi determinada por contagem utilizando-se um microscópio e o auxílio de uma câmara de Neubauer espelhada.

Utilizando-se o esquema proposto em UFSC (2010), Figura 2, no qual são contados os quatro quadrados maiores dos cantos da câmara e o quadrado maior da parte central, que depois de somados são divididos por cinco e multiplicado por vinte e cinco, número total de quadrados maiores da câmara, resultando um número X. Como a câmara de Neubauer possui 400 quadrados menores, cada um com uma área de 0,0025 mm<sup>2</sup> e profundidade de 0,1 mm, o resultado da concentração celular será expresso em valores na ordem de grandeza de X 10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>.

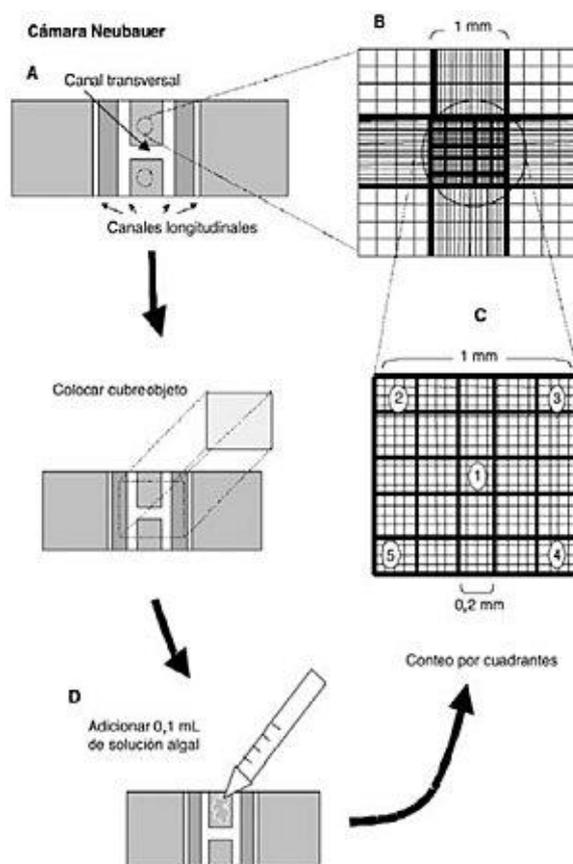


Figura 2 - Esquema de uso da câmara de Neubauer  
Fonte: UFSC (2010)

### 3.3.2 Determinação das velocidades de crescimento

O balanço de massa celular de forma simplificada em um fotobiorreator pode ser representado pela equação 3.

$$\left[ \frac{d(XV)}{dt} \right]_{\text{acúmulo}} = X \cdot F_0 - X \cdot F + r_x V \quad (3)$$

Onde:

$$\left[ \frac{d(XV)}{dt} \right]_{\text{acúmulo}} = \text{acúmulo de massa celular por unidade de tempo}$$

$X \cdot F_0$  = fluxo de massa que entra no sistema

$X \cdot F$  = fluxo de massa que sai do sistema

$r_x V$  = massa gerada pela reação

Considerando a produção celular num sistema fechado do tipo batelada com volume constante, resulta em que o fluxo de massa de entrada e massa de saída são iguais a zero, o acúmulo celular é função somente da velocidade de geração de células.

$$V \left[ \frac{d(X)}{dt} \right]_{\text{acúmulo}} = r_x V \quad (4)$$

Deve-se buscar uma função para a velocidade de reação de geração, a qual deve ser expressa por uma equação algébrica, para crescimento geralmente se expressa por uma função linear da própria concentração celular. Para um sistema batelada (fotobiorreator batelada) com volume constante operando na fase exponencial considera-se que a velocidade de reação celular é proporcional a concentração celular multiplicada pela velocidade específica de crescimento constante, equação 05.

$$r_x = \mu \cdot X \quad (5)$$

Substituindo a equação 5 na equação 4 e simplificando o volume, tem-se

$$\left[ \frac{d(X)}{dt} \right]_{\text{acúmulo}} = \mu \cdot X \quad (6)$$

O termo à esquerda da equação 6 pode ser caracterizado pela taxa de geração celular, para um fotobiorreator batelada o acúmulo coincide com a taxa de geração, equação 7.

$$\left[ \frac{d(X)}{dt} \right]_{\text{acúmulo}} = \left[ \frac{d(X)}{dt} \right]_{\text{geração}} \quad (7)$$

A velocidade específica também pode ser determinada pela equação 8, plotando-se as concentrações em um gráfico em função do tempo e procedendo ao cálculo das tangentes e dividindo-se pelas concentrações nos pontos tangenciais. Obtem-se uma série de valores de velocidade específicas, optando por uma média representativa.

$$\frac{1}{\bar{X}} \left[ \frac{d(X)}{dt} \right]_{\text{geração}} = \mu \quad (8)$$

Para este caso específico, observações experimentais mostram que a fase lag pode ser negligenciada, assim, podemos integrar a equação 6 com os limites inferiores de integração considerando o tempo inicial zero e a concentração inicial  $X_0$  do início do experimento

$$\int_{X_0}^X \frac{d(X)}{X} = \mu \int_0^t dt \quad (9)$$

Considerando velocidade específica constante na fase exponencial e integrando:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t \quad (10)$$

Rearranjando os termos da equação 10, para obter a concentração celular em função do tempo na fase exponencial:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (11)$$

O modelo não linear da equação 11 requer a estimativa do parâmetro  $\mu$ , já comentado anteriormente. Neste trabalho optou-se pelo método dos mínimos quadrados do modelo linearizado, equação 10, onde a reta é forçada a coincidir com a origem para obter a condição inicial de acordo com o valor experimental, Figura 3.

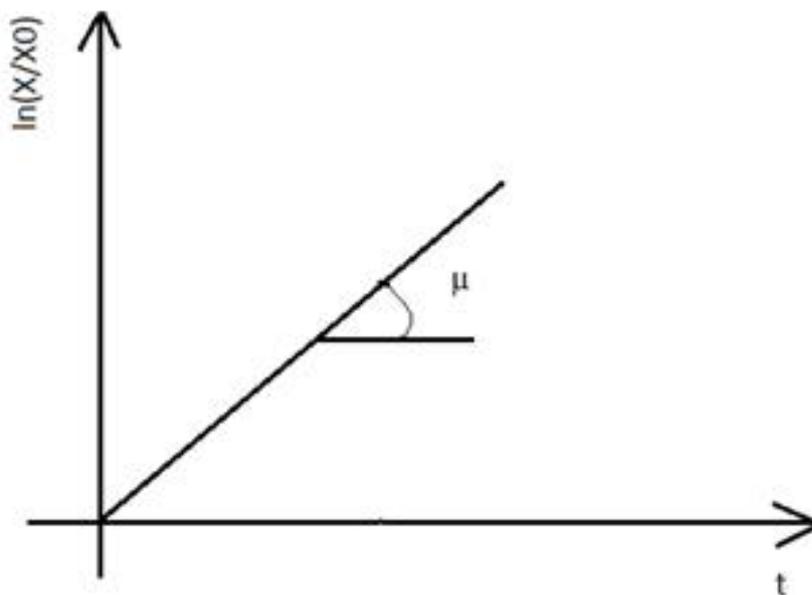


Figura 3 – Procedimento de ajuste linear. O coeficiente angular da reta pode ser obtido facilmente, representando a velocidade específica de crescimento constante na fase exponencial.

A avaliação da velocidade específica de crescimento da microalga é um método eficaz para avaliar a reprodução destas, as quais apresentam ciclo de vida curto, evitando desta maneira desperdícios de recursos, por se determinar o tempo ótimo para sua colheita (PEREIRA FILHO *et al.*, 2010).

### 3.3.3 Cultivo sem fotoperíodo

Os cultivos foram divididos em duas etapas, na primeira foram avaliadas as concentrações da água residuária bruta de cervejaria associados aos microrganismos nitrificantes. Na segunda etapa, após seleção da concentração da água residuária bruta de cervejaria e quantidade do microrganismo nitrificante, foram feitos as repicagens para obtenção da biomassa.

No primeiro experimento os tratamentos foram divididos entre os dois microrganismos nitrificantes. Com volumes de 50,00 mL, e concentração inicial da microalga *Scenedesmus subspicatus* de  $10,25 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, estes foram colocados sobre bancada com lâmpadas fluorescentes de 40 W, luz do dia, de forma contínua, com intensidade luminosa de 2.000 lux, sem aeração.

Para o produto comercial Nite Out II, conforme Tabela 1, os tratamentos foram:

Tratamento 1 - 100% de água residuária (testemunha)

Tratamento 2 - 100% de água residuária + 1,00 mL de Nite Out II

Tratamento 3 - 40% de água residuária + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 2)

Tratamento 4 - 40% de água residuária + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 1)

Tratamento 5 - 25% de água residuária + 1,00 mL de Nite Out II

Tratamento 6 - 25% de água residuária

Tabela 1 – Valores codificados dos tratamentos utilizando água residuária de cervejaria associado ao Nite Out II

Tratamentos	Valores codificados	
	[água residuária]	[mo]
1	(+1)	(-1)
2	(+1)	(+1)
3 (repetição 2)	0	0
4 (repetição 1)	0	0
5	(-1)	(+1)
6	(-1)	(-1)

Para a cepa de *Pseudonocardia nitrificans*, conforme Tabela 2, os tratamentos foram:

Tratamento 1 - 100% de água residuária (testemunha)

Tratamento 2 - 100% de água residuária + 1,00 mL *Pseudonocardia nitrificans*

Tratamento 3 - 40% de água residuária + 0,50 mL *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 2)

Tratamento 4 - 40% de água residuária + 0,50 mL *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 1)

Tratamento 5 - 25% de água residuária + 1,00 mL *Pseudonocardia nitrificans*

Tratamento 6 - 25% de água residuária

Tabela 2 – Valores codificados dos tratamentos utilizando água residuária de cervejaria associado a *Pseudonocardia nitrificans*

Tratamentos	Valores codificados	
	[água residuária]	[mo]
1	(+1)	(-1)
2	(+1)	(+1)
3 (repetição 2)	0	0
4 (repetição 1)	0	0
5	(-1)	(+1)
6	(-1)	(-1)

Na segunda etapa os cultivos foram iniciados nos dois meios, MC e água residuária de cervejaria associada com microrganismo nitrificante, *Pseudonocardia nitrificans*, a qual apresentou maiores velocidades específicas de crescimento, e sem associação. Com volumes de 30,00 mL, e concentração inicial da microalga *Scenedesmus subspicatus* de  $12,00 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, sendo este repicado a cada sete dias mantendo-se constante a concentração inicial, estes foram colocados sobre bancada com lâmpadas fluorescentes de 40 W, luz do dia, de forma contínua, com intensidade luminosa de 2.000 lux. Somente a partir da primeira repicagem sofreram aeração.

Tratamento 1 – 29,10 mL de meio MC + 0,90 mL de *Pseudonocardia nitrificans*.

Tratamento 2 – 30,00 mL de meio MC sem microrganismo

Tratamento 3 – 29,10 mL de água residuária + 0,90 mL de *Pseudonocardia nitrificans*.

Tratamento 4 – 30,00 mL água residuária sem microrganismo

### 3.3.5 Produtividade de biomassa

O material obtido nos cultivos foi submetido à centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos, para separação da biomassa, a qual posteriormente foi seca em estufa a 85°C durante 24 horas.

Sendo a produtividade obtida pela relação entre a biomassa seca e o volume de cultivo num determinado intervalo de tempo.

### 3.3.6 Produtividade de lipídios

Após secagem, a biomassa algal foi pesada e triturada, sendo transferidas para um papel filtro e colocadas em sistema de extração de lipídios tipo Soxhlet, utilizando-se como solvente extrator éter de petróleo. As amostras permaneceram em refluxo durante oito horas.

Após desengorduradas, as amostras foram secas em estufa a 85°C para eliminação do excesso de solvente. Depois de retiradas da estufa foram colocadas em dessecador para estabilizar a temperatura com a temperatura ambiente para posterior pesagem.

O conteúdo lipídico foi determinado pela diferença entre o peso inicial da amostra e o peso da amostra depois de desengordurada.

### 3.3.7 Delineamento experimental

Para determinação da melhor concentração da água residuária de cervejaria para uso como meio alternativo ao cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus* associada a diferentes concentrações de microrganismos nitrificantes, um pool de bactérias (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira*) e *Pseudonocardia nitrificans*, foram realizados dois experimentos. Os quais passaram por ajustes lineares para estimar as velocidades específicas de crescimento.

O delineamento experimental foi do tipo completo  $2^2$  ( $2^k$ ), dois fatores (k) e dois níveis com todas as combinações possíveis entre todos os níveis de cada fator, e mais dois pontos, cujo objetivo é obter uma inferência estatística maior, com a variável velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) como variável dependente e as variáveis concentração da água residuária e concentração dos microrganismos nitrificantes como variáveis independentes.

Ensaio no ponto central ou próximos a este, podem fornecer informações muito úteis sobre respostas entre os níveis inicialmente atribuídos aos fatores, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo, comprovando se o ajuste é adequado ou não.

Para avaliar a produtividade de biomassa e teor de lipídios da mesma foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro tratamentos e cinco repetições, os dados foram submetidos à análise de variância e teste F e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para tratar os dados obtidos experimentalmente foram utilizados os programas Excel e o Statistica<sup>®</sup> 8.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização físico-química da água residuária de cervejaria

Os valores apresentados na tabela 3 correspondem aos parâmetros físico-químicos analisados para a água residuária bruta de cervejaria que foram determinados no laboratório.

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos analisados para a água residuária de cervejaria

Parâmetro	Concentração determinada ( mg L <sup>-1</sup> )
Nitrogênio amoniacal	20,9
Nitrato	4,15
Nitrito	0,27
Ortofosfato	2,73
pH	6,57

Para os parâmetros inorgânicos, somente o nitrogênio amoniacal é previsto na resolução 430/11 do Conama, tendo um limite máximo de 20 mg L<sup>-1</sup>, para lançamento em corpos receptores. Não podendo esta água residuária ser lançada diretamente no corpo receptor sem tratamento prévio.

Sendo as fontes de nitrogênio utilizadas pela microalga a amoniacal e o nitrito, e a fonte de fósforo o ortofosfato, os quais se encontram na água residuária da cervejaria numa relação N:P em torno de 20:1, com um excesso de nitrogênio, prestando-se portanto para o cultivo de microalgas.

### 4.2 Velocidades específicas de crescimento

A velocidade específica de crescimento é a razão entre o número de células produzidas pela unidade de tempo, determinadas na fase exponencial de crescimento conforme curvas de crescimento.

Na Figura 4, são apresentadas as curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associado com diferentes concentrações de Nite Out II.

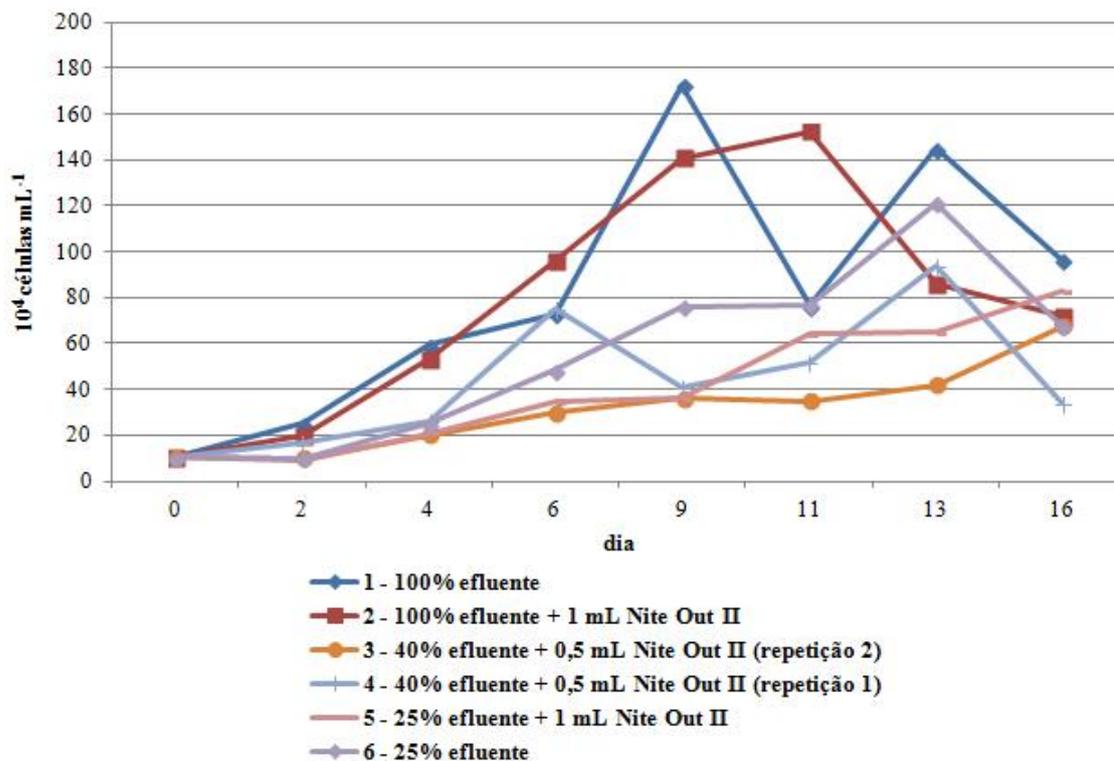


Figura 4 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II.

Os dados relativos ao aumento da concentração de células da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivadas com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II foram linearizados pela transformação dos mesmos em logaritmo neperiano da concentração dividida pela concentração inicial ( $\ln(X/X_0)$ ) na fase exponencial de crescimento. Resultando na equação de uma reta, na qual o coeficiente angular representa as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ).

Estes gráficos, Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10, apresentaram coeficientes de correlação altos, 0,9622, 0,9768, 0,9973, 0,9431, 0,9906 e 0,9881, respectivamente, representando uma alta associação das duas variáveis.

No gráfico da Figura 5, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 01, 100% de água residuária de cervejaria, igual a  $0,36 \text{ d}^{-1}$ .

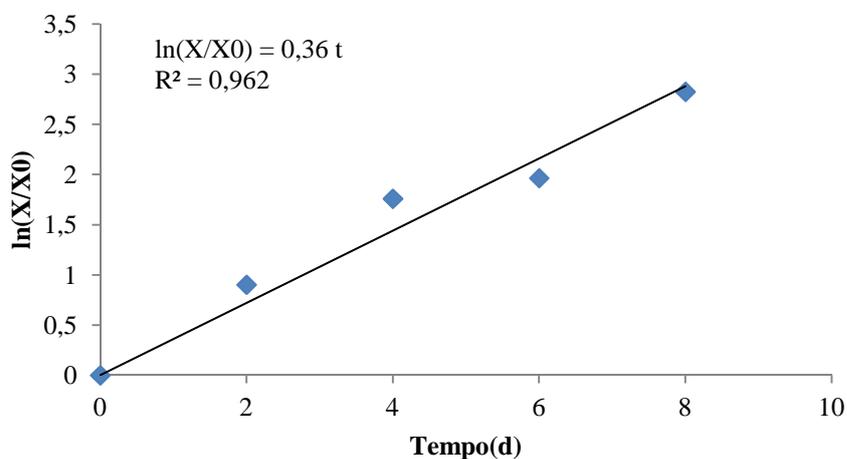


Figura 5 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 100% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 01.

No gráfico da Figura 6, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 02, 100% água residuária de cervejaria e 1,00 mL de Nite Out II, igual a  $0,3525 \text{ d}^{-1}$ .

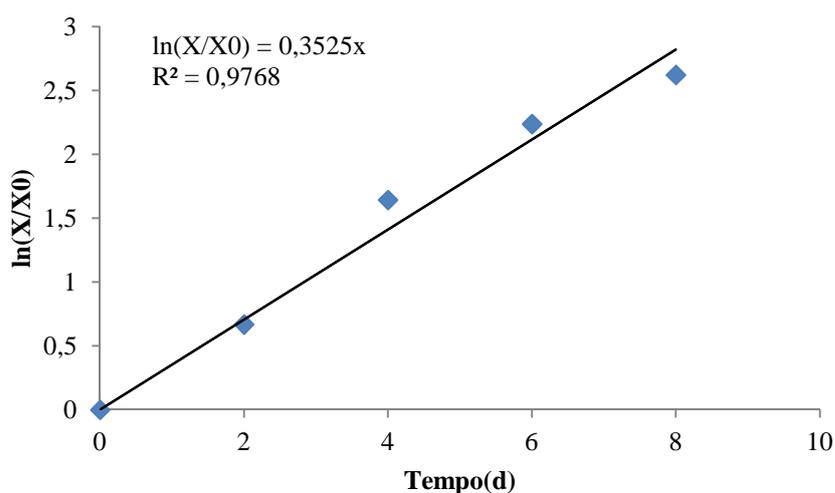


Figura 6 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 100% água residuária de cervejaria + 1,00 mL de Nite Out II na fase exponencial do crescimento – experimento 02.

No gráfico da Figura 7, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 03, 40% água residuária de cervejaria e 0,50 mL de Nite Out II (repetição 2), igual a  $0,1753 \text{ d}^{-1}$ .

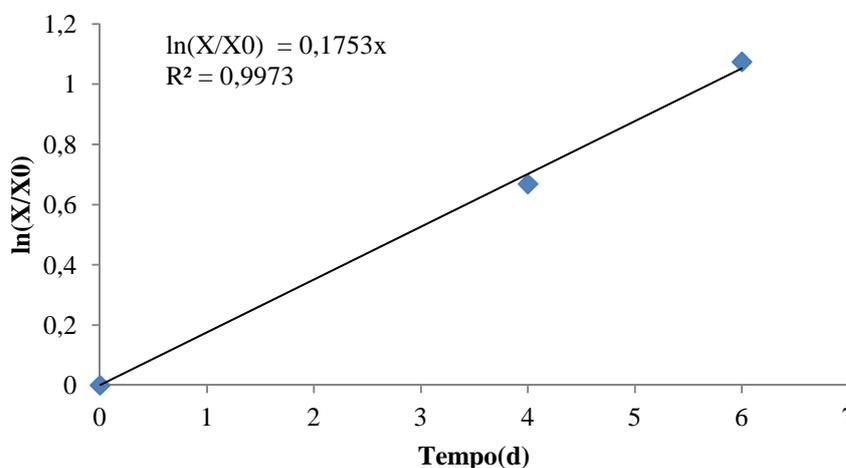


Figura 7 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 2) na fase exponencial do crescimento – experimento 03.

No gráfico da Figura 8, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 04, 40% água residuária de cervejaria e 0,50 mL de Nite Out II (repetição 1), igual a  $0,2967 \text{ d}^{-1}$ .

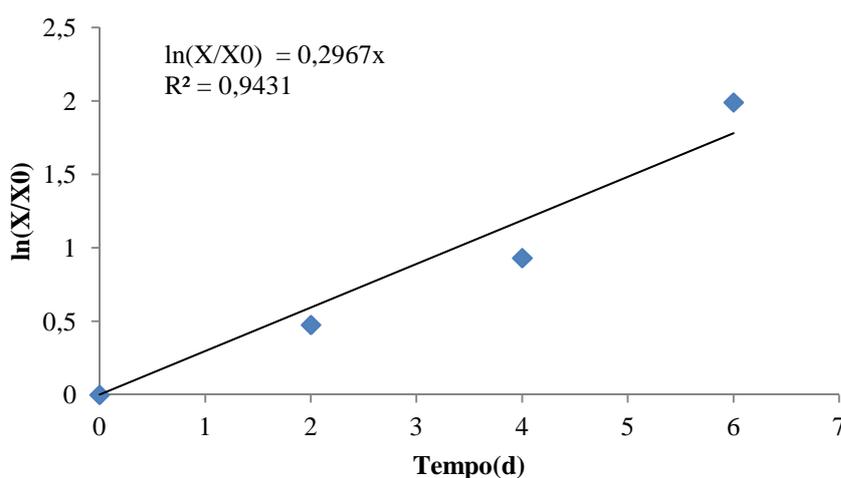


Figura 8 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 mL de Nite Out II (repetição 1) na fase exponencial do crescimento – experimento 04.

No gráfico da Figura 9, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 05, 25% água residuária de cervejaria e 1,00 mL de Nite Out II, igual a  $0,1969 \text{ d}^{-1}$ .

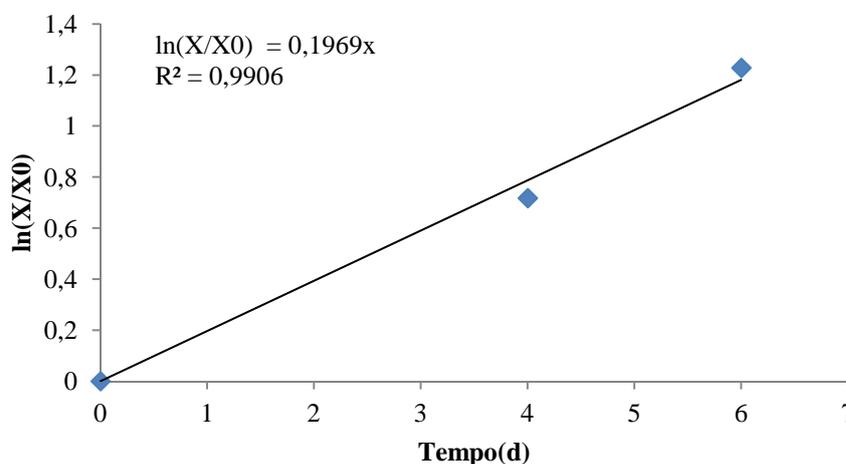


Figura 9 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 25% água residuária de cervejaria + 1,00 mL de Nite Out II na fase exponencial do crescimento – experimento 05.

No gráfico da Figura 10, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 06, 25% água residuária de cervejaria, igual a  $0,2479 \text{ d}^{-1}$ .

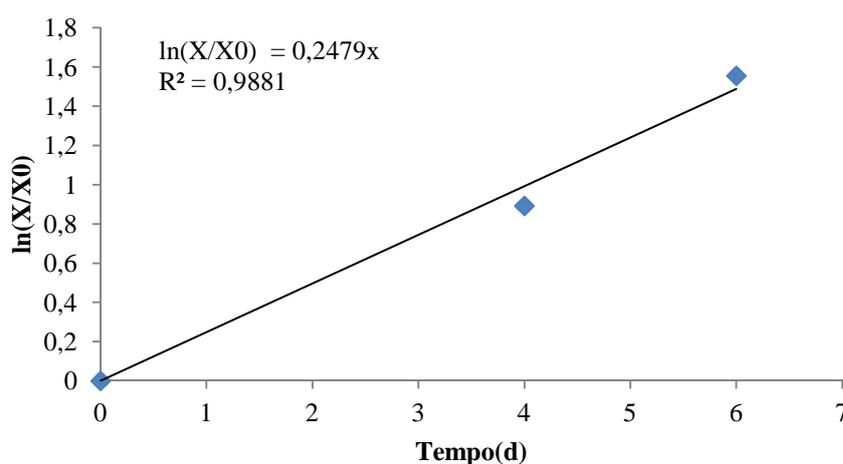


Figura 10 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 25% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 06.

Na Tabela 4, análise de variância da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II, verificou-se que não houve diferença significativa para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) da microalga ao serem comparados os fatores ao nível de 5% de significância.

Apresentando variância ( $s^2$ ) de 0,0037006, indicando que os valores encontrados estão muito perto dos valores esperados.

Tabela 4 - Análise de variância da velocidade específica de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de Nite Out II.

CV	GL	SQ	QM	F calculado	F tabelado
[água residuária]	1	0,02432	0,023432	6,331993 <sup>ns</sup>	18,5
[mo]	1	0,000900	0,000900	0,243204 <sup>ns</sup>	18,5
Interação	1	0,000400	0,000400	0,108091 <sup>ns</sup>	18,5
Erro	2	0,003701	0,00371		
Total	5				

<sup>ns</sup> não significativo pelo teste F a 5% de significância.  $s^2 = 0,0037006$ .  $R^2 = 76,96\%$

Através do gráfico de Pareto, Figura 11, gerado pelo programa Statistica 8.0<sup>®</sup>, o qual apresenta as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada dos experimentos, observa-se também que não houve significância dos parâmetros analisados a 5%, nem da interação dos mesmos.

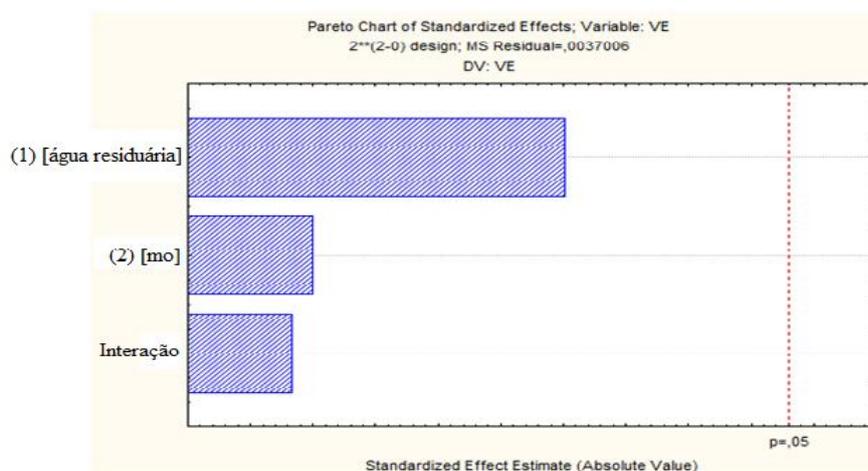


Figura 11 - Gráfico de Pareto apresentando as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada a 5% de significância.

Na Tabela 5, são apresentados os dados originais e codificados que deram origem a determinação das velocidades específicas máximas calculadas ( $\mu_{\text{calculada}}$ ) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de Nite Out II, conforme tratamento proposto.

Estes foram calculados usando o modelo, equação 12, gerado a partir da superfície de resposta apresentada na Figura 12, a qual apresenta coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 76,96%, sendo considerado um bom valor para a proporção da variação explicada pela regressão.

Na coluna tratamentos da Tabela 5, o item teste refere-se a simulação do fatores sobre a velocidade específica de crescimento, que não responde significativamente ao aumento da concentração destes.

Tabela 5 - Dados originais e codificados para determinação das velocidades específicas máximas (calculada) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de Nite Out II, conforme tratamento proposto.

Tratamentos	Valores codificados		Valores Originais		Variável de resposta	
	[água residuária]	[mo]	[água residuária]	[mo]	$\mu$	$\mu_{\text{calculada}}$
1	(+1)	(-1)	100%	0 mL	0,360	0,350
2	(+1)	(+1)	100%	1,00 mL	0,350	0,340
3	0	0	40%	0,50 mL	0,170	0,213
4	0	0	40%	0,50 mL	0,290	0,213
5	(-1)	(+1)	25%	1,00 mL	0,190	0,155
6	(-1)	(-1)	25%	0 mL	0,240	0,205
Teste			100%	1,00 mL		0,345

A adição de Nite Out II não afetou a velocidade específica de crescimento da micro alga *Scenedesmus subspicatus* associada com a água residuária bruta de cervejaria, sendo a principal influência no aumento da velocidade específica de crescimento a própria concentração da água residuária bruta de cervejaria.

No tratamento 6, constituído por 25% de água residuária bruta de cervejaria, determinou-se uma velocidade específica de crescimento de  $0,24 \text{ d}^{-1}$ , sendo esta trinta por cento menor que no tratamento 1, constituído por 100% de água residuária bruta de cervejaria, o qual apresentou velocidade específica de crescimento de  $0,36 \text{ d}^{-1}$ .

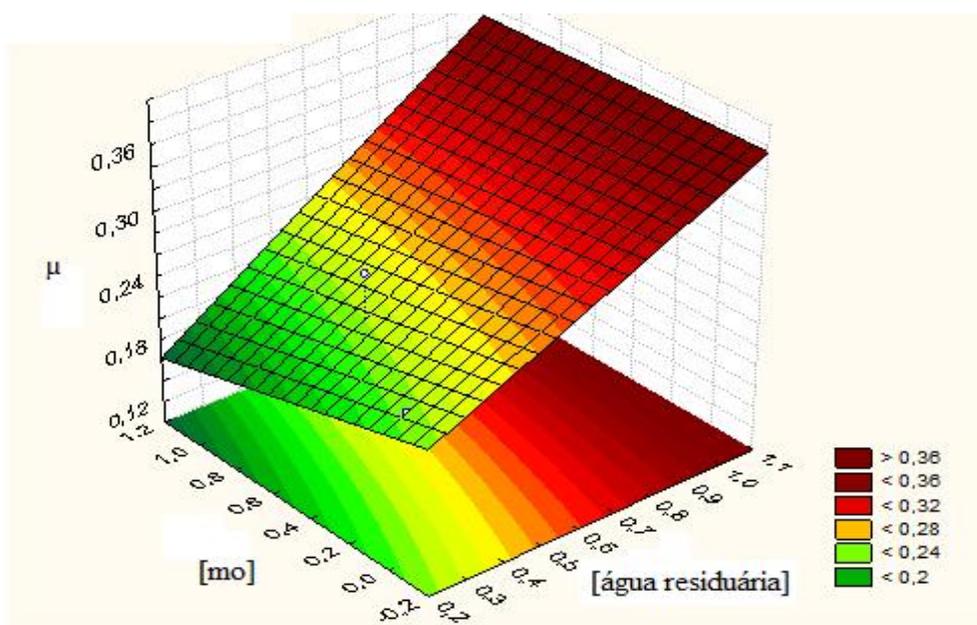


Figura 12 - Superfície de resposta para velocidade de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária e diferentes concentrações de Nite Out II.

$$Z=0,192+0,166.X-0,063.Y+0,053.X.Y \quad (12)$$

Onde:

Z – velocidade específica de crescimento ( $\mu$ )

X – concentração da água residuária de cervejaria

Y – concentração de Nite Out II

Segundo Abreu (1994), a concentração do íon amônio de 10 a 150 mg L<sup>-1</sup> se torna inibitória para bactérias *Nitrosomonas* sp., e as bactérias *Nitrobacter* sp. apresentam inibição em concentrações do íon amônio de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>.

Tendo a água residuária de cervejaria apresentado um concentração de 20,9 mg L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal, poderia ser está uma das causas que influenciaram os experimentos utilizando a água residuária de cervejaria associada ao produto Nite Out II.

Na figura 13, são apresentadas as curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associado com diferentes concentrações da bactéria *Pseudonocardia nitrificans*.

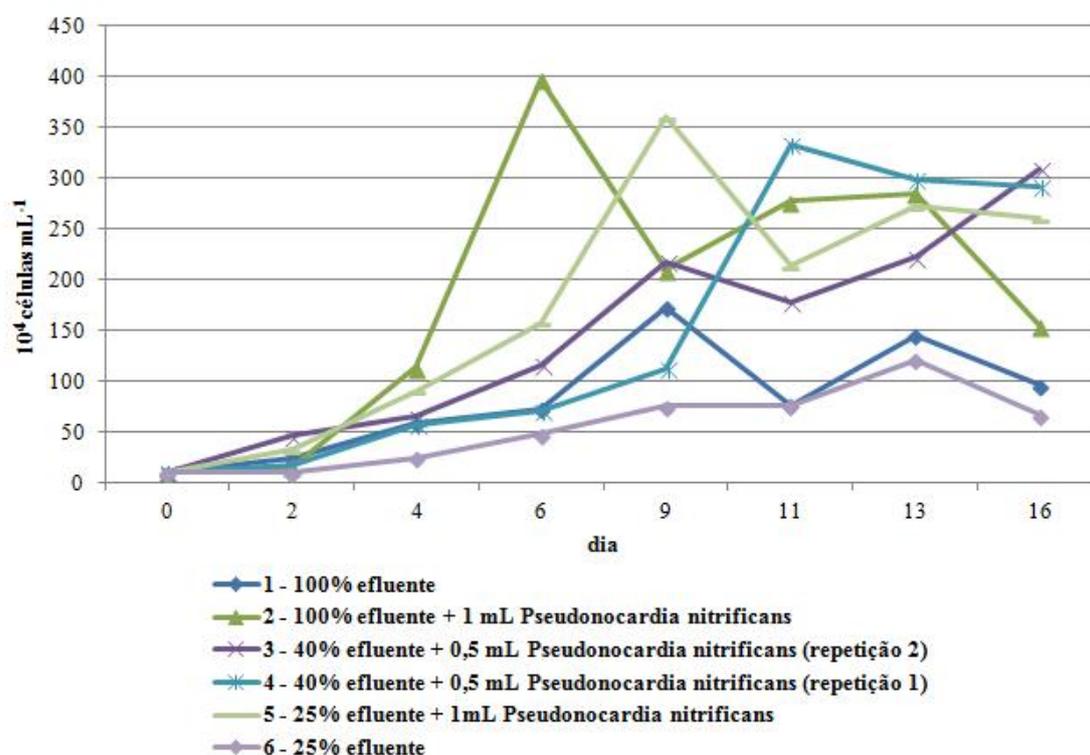


Figura 13 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans*.

Também os dados relativos ao aumento da concentração de células *Scenedesmus subspicatus* cultivadas com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans* foram linearizados pela transformação dos mesmos em logaritmo neperiano da concentração dividido pela concentração inicial ( $\ln(X/X_0)$ ) na fase exponencial de crescimento. Resultando na equação da uma reta, na qual o coeficiente angular representa as velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ).

Estes gráficos, Figuras 14, 15, 16, 17, 18 e 19, apresentaram coeficientes de correlação altos, 0,962, 0,9802, 0,8618, 0,9403, 0,9775 e 0,9881, respectivamente, representando uma alta associação das duas variáveis.

No gráfico da Figura 14, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 01, 100% água residuária de cervejaria, igual a  $0,36 \text{ d}^{-1}$ .

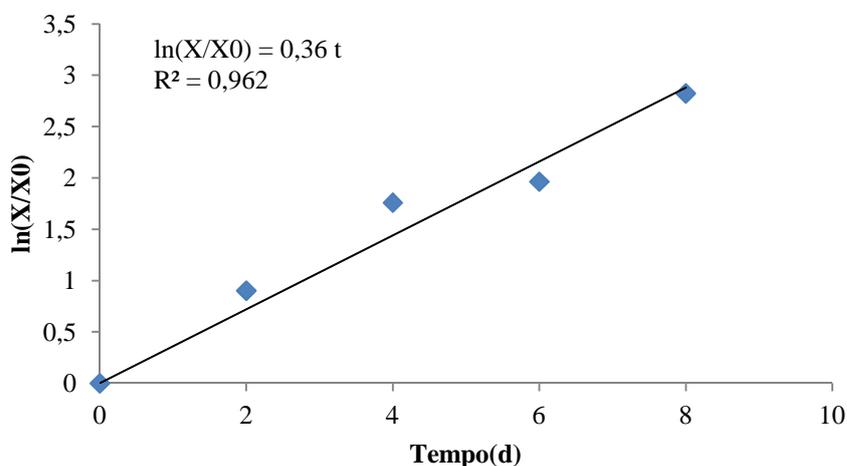


Figura 14 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 100% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 01.

No gráfico da Figura 15, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 02, 100% água residuária de cervejaria e 1,00 ml de *Pseudonocardia nitrificans*, igual a  $0,8427 \text{ d}^{-1}$ .

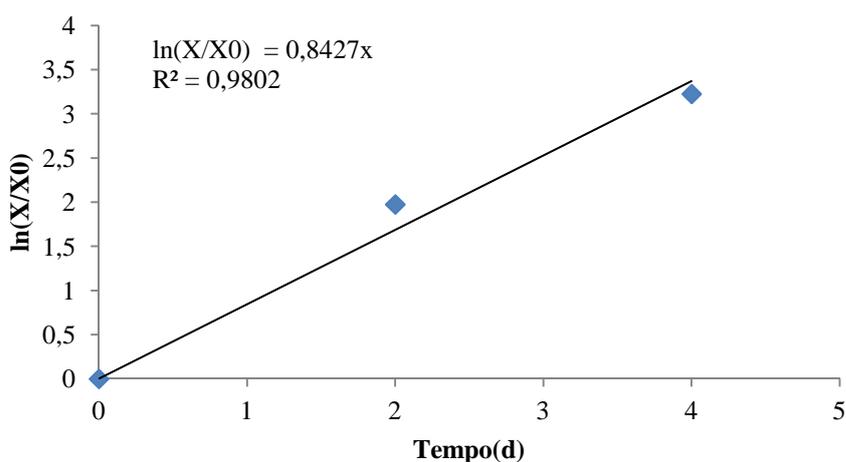


Figura 15 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 100% água residuária de cervejaria + 1,00 ml de *Pseudonocardia nitrificans* na fase exponencial do crescimento – experimento 02.

No gráfico da Figura 16, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 03, 40% água residuária de cervejaria e 0,50 ml de *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 2), igual a  $0,4463 \text{ d}^{-1}$ .

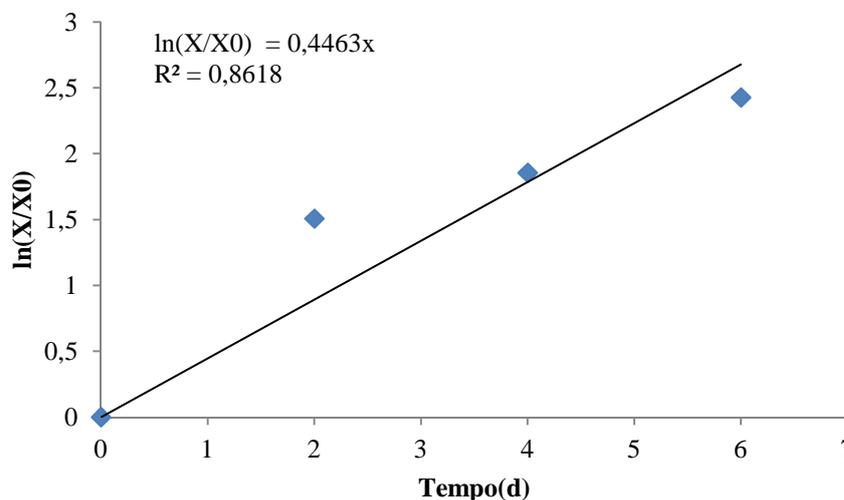


Figura 16 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 ml de *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 2) na fase exponencial do crescimento – experimento 03.

No gráfico da Figura 17, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 04, 40% água residuária de cervejaria e 0,50 ml de *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 1), igual a  $0,397 \text{ d}^{-1}$ .

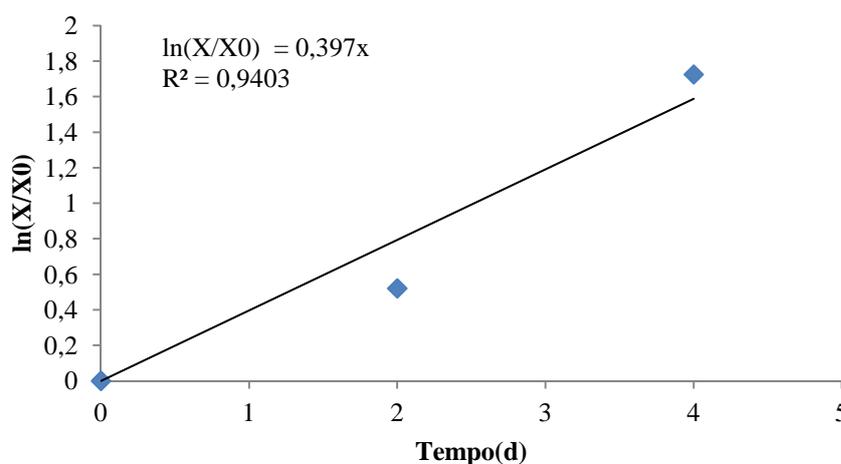


Figura 17 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 40% água residuária de cervejaria + 0,50 ml de *Pseudonocardia nitrificans* (repetição 1) na fase exponencial do crescimento – experimento 04.

No gráfico da Figura 18, se obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 05, 25% água residuária de cervejaria e 1,00 ml de *Pseudonocardia nitrificans*, igual a  $0,4655 \text{ d}^{-1}$ .

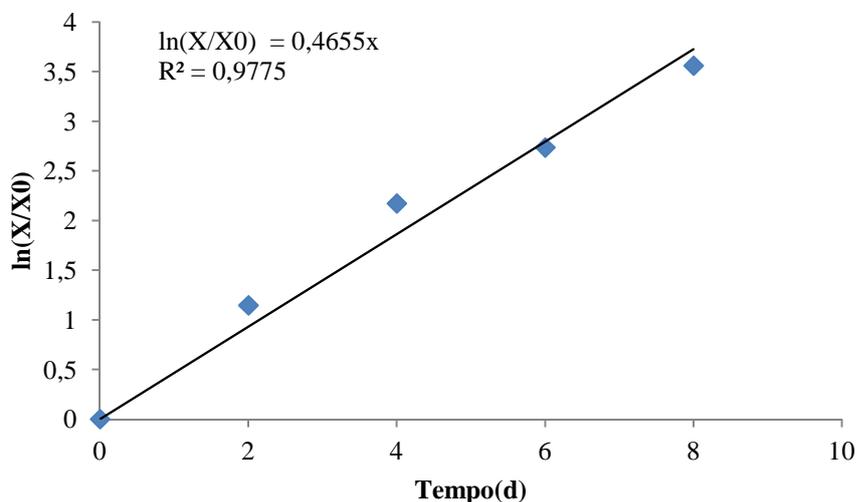


Figura 18 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 25% água residuária de cervejaria + 1,00 ml de *Pseudonocardia nitrificans* na fase exponencial do crescimento – experimento 05.

No gráfico da Figura 19, obtém a velocidade específica de crescimento, coeficiente angular da reta, sendo para o experimento 06, 25% água residuária de cervejaria, igual a  $0,2479 \text{ d}^{-1}$ .

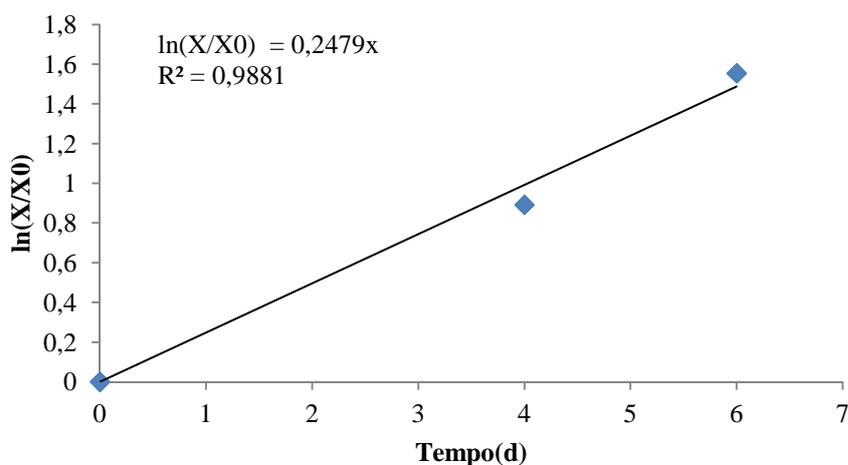


Figura 19 - Gráfico de linearização dos dados de crescimento celular da microalga *Scenedesmus subspicatus* em 25% água residuária de cervejaria na fase exponencial do crescimento – experimento 06.

Na tabela 6, análise de variância da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans*, verificou-se que houve diferença significativa para a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) da microalga ao serem comparados os fatores ao nível de 5% de significância.

Apresentando variância ( $s^2$ ) de 0,001597, indicando que os valores encontrados estão muito perto dos valores esperados.

Tabela 6 - Análise de variância da velocidade específica de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada com diferentes concentrações de água residuária de cervejaria e diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans*.

CV	GL	SQ	QM	F calculado	F tabelado
[água residuária]	1	0,065089	0,065089	40,75662*	18,5
[mo]	1	0,122500	0,122500	76,70518*	18,5
Interação	1	0,016900	0,016900	10,58218 <sup>ns</sup>	18,5
Erro	2	0,003194	0,001597		
Total	5				

\* significativo, <sup>ns</sup> não significativo pelo teste F a 5% de significância.  $s^2 = 0,001597$ .  $R^2 = 98,5\%$

Através do gráfico de Pareto, Figura 20, o qual apresenta as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada dos experimentos, demonstrou que houve significância para ambos parâmetros analisados a 5%, porém não houve para a interação dos mesmos.

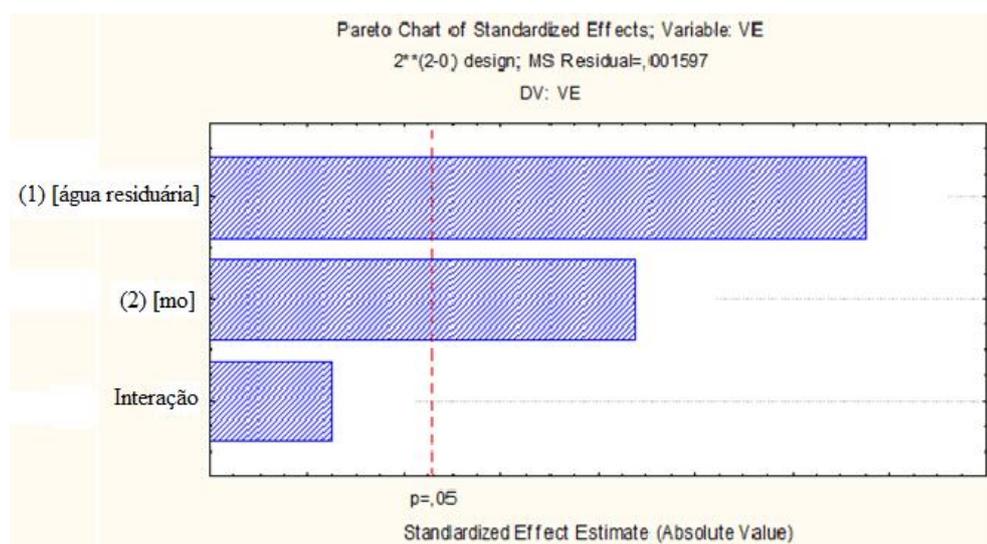


Figura 20 - Gráfico de Pareto apresentando as estimativas absolutas dos efeitos para a análise multivariada a 5% de significância.

Na tabela 7, são apresentados os dados originais e codificados que deram origem a determinação das velocidades específicas máximas (calculada) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans*, conforme tratamento proposto.

Estes foram calculados usando o modelo, equação 13, gerado a partir da superfície de resposta apresentada na figura 21, a qual apresenta coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 98,5%, sendo considerado um bom valor para a proporção da variação explicada pela regressão.

Na coluna tratamentos da Tabela 7, o item teste refere-se a simulação dos fatores sobre a velocidade específica de crescimento, a qual responde significativamente ao aumento da concentração destes, e que quanto maior as concentrações da água residuária e da *Pseudonocardia nitrificans*, maiores as velocidades específicas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus*.

Tabela 7 - Dados originais e codificados para determinação das velocidades específicas máximas (calculada) utilizando-se diferentes concentrações de água residuária de cervejaria associados a diferentes concentrações de *Pseudonocardia nitrificans*, conforme tratamento proposto.

Tratamentos	Valores codificados		Valores Originais		Variável de resposta	
	[água residuária]	[mo]	[água residuária]	[mo]	$\mu$	$\mu_{calculada}$
1	(+1)	(-1)	100%	0 mL	0,360	0,362
2	(+1)	(+1)	100%	1,00 mL	0,840	0,835
3	0	0	40%	0,50 mL	0,460	0,408
4	0	0	40%	0,50 mL	0,390	0,408
5	(-1)	(+1)	25%	1,00 mL	0,460	0,469
6	(-1)	(-1)	25%	0 mL	0,240	0,251
Teste			50%	1,00 mL		0,591

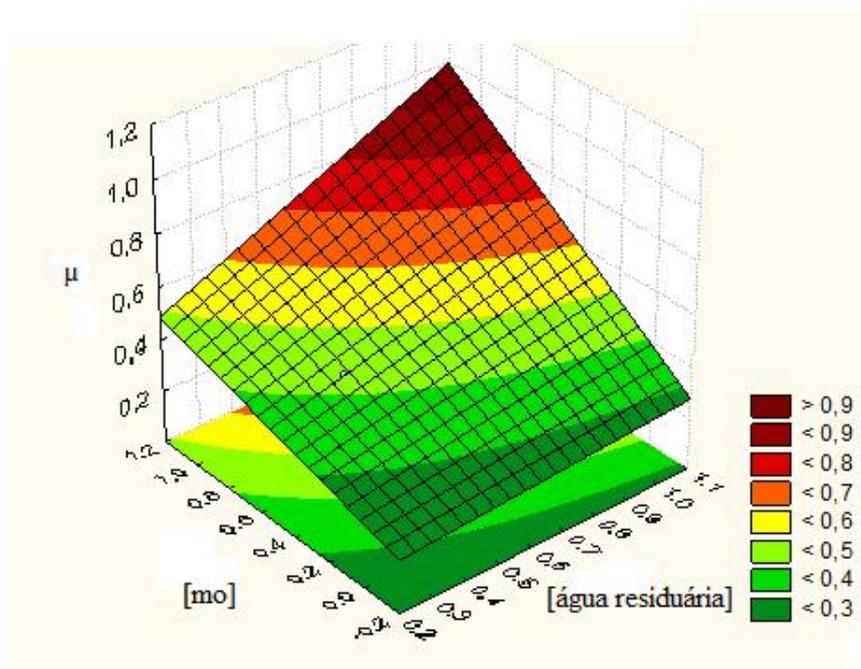


Figura 21 - Superfície de resposta para velocidade de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* com diferentes concentrações de água residuária e diferentes concentrações da bactéria *Pseudonocardia nitrificans*.

$$Z=0,214+0,148.X-0,133.Y+0,34.X.Y \quad (13)$$

Onde:

Z – velocidade específica de crescimento ( $\mu$ )

X – concentração da água residuária de cervejaria

Y – concentração da bactéria *Pseudonocardia nitrificans*

O tratamento 3 foi o que apresentou maior velocidade específica de crescimento,  $\mu = 0,840 \text{ d}^{-1}$ , sendo este constituído por 100% água residuária de cervejaria e 1,00 ml do microrganismo nitrificante *Pseudonocardia nitrificans*. Sendo este então adotado para o cultivo destinado a produção de biomassa e lipídios.

A partir da curva de crescimento do trabalho de Pereira Filho (2010), o qual determinou o tempo ideal de coleta para a microalga *Scenedesmus subspicatus* como sendo a cada dois dias, sendo considerado ótimo até dezesseis dias para obtenção de óleo para produção de biodiesel, tem-se uma velocidade específica de crescimento de  $0,3459 \text{ d}^{-1}$ . Sendo esta menos da metade da velocidade obtida com o cultivo em 100% água residuária de cervejaria associada com 1,00 mL da bactéria *Pseudonocardia nitrificans*.

Cunha (2011), avaliando velocidade específica de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em quatro tipos de tratamentos, sendo  $TC_1$  – densidade celular inicial  $4,60 \cdot 10^4 \text{ células mL}^{-1}$ , meio Chu;  $TC_2$  – densidade celular inicial  $6,48 \cdot 10^4 \text{ células mL}^{-1}$ ,

meio Chu; TCG<sub>1</sub> – densidade celular inicial  $7,20 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, e TCG<sub>2</sub> – densidade celular inicial  $7,82 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, relata que não houve diferença significativa entre os tratamentos, tendo estes velocidades de crescimento de 0,64 divisões d<sup>-1</sup>; 0,65 divisões d<sup>-1</sup>; 0,62 divisões d<sup>-1</sup>, e 0,62 divisões d<sup>-1</sup>, respectivamente, em volumes de 20 mL de meio e 10 dias de cultivo. Sendo também inferior a velocidade obtida com o cultivo em 100% água residuária de cervejaria associada com 1,00 mL da bactéria *Pseudonocardia nitrificans*.

Neste trabalho os valores obtidos para as velocidades específicas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* usando 100% água residuária de cervejaria associada a 1,00 mL da bactéria nitrificante *Pseudonocardia nitrificans* foram superior aos obtidos por Nascimento *et al.* (2011), os quais avaliando as velocidades específicas de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus*, em laboratório, utilizando quatro tratamentos sendo eles, tratamento 1 - 100% do meio de cultura Provasoli, tratamento 2 – 50% meio de cultura Provasoli + 50% de moringa, tratamento 3 – 100% do fertilizante N:P:K na proporção 20:10:10, e tratamento 4 – 50% N:P:K e 50% moringa, tendo o tratamento 4 a maior velocidade específica de crescimento de 0,452593017 divisões por dia, seguido pelo tratamento 3 com velocidade específica de crescimento de 0,438327093 divisões por dia, e o tratamento 1, meio convencional, com uma velocidade específica de crescimento de 0,4268206 divisões por dia, ficando em terceiro.

### 4.3 Produtividade de Biomassa

Na tabela 8, análise de variância da produtividade de biomassa da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada em meio MC e água residuária de cervejaria associados ou não a *Pseudonocardia nitrificans*, verificou-se que houve diferença significativa para a produtividade de biomassa da microalga *Scenedesmus subspicatus* ao serem comparados os tratamentos ao nível de 5% de significância.

Tabela 8 - Análise de variância da produtividade de biomassa da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada em meio MC e água residuária de cervejaria associados ou não a *Pseudonocardia nitrificans*.

CV	GL	SQ	QM	F calculado	F tabelado
Tratamento	3	0,4862	0,1621	10,37*	3,24
Resíduo	16	0,2501	0,0156		
Total	19	0,7363			

\* significativo pelo teste F a 5% de significância.

As produtividades de biomassa podem ser observadas na tabela 9, onde os tratamentos 1, meio MC associado com *Pseudonocardia nitrificans*, tratamento 2, meio MC e tratamento 3, água residuária de cervejaria associada com *Pseudonocardia nitrificans*, não diferem estatisticamente, sendo superiores ao tratamento 4, água residuária de cervejaria.

Tabela 9 - Produtividade de biomassa da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada em diferentes meios de cultivo: meio MC com *Pseudonocardia nitrificans* (tratamento 1), meio MC (tratamento 2), água residuária de cervejaria com *Pseudonocardia nitrificans* (tratamento 3), água residuária de cervejaria (tratamento 4).

Tratamento	Produtividade de biomassa (g L <sup>-1</sup> semana <sup>-1</sup> )
1	0,4988 <sup>a</sup>
2	0,4815 <sup>a</sup>
3	0,4023 <sup>a</sup>
4	0,1107 <sup>b</sup>

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quevedo, Morales e Acosta (2008), em seu trabalho com *Scenedesmus* sp, cultivada em três diferentes meios (padrão 1, padrão 2 e algal), conseguiram 0,010 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; 0,010 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, e 0,010 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectivamente, de produtividade de biomassa. Representando cerca de 17,4% da produtividade obtida no tratamento 3, água residuária de cervejaria associada com *Pseudonocardia nitrificans*.

Cunha (2011), avaliando quantidade de biomassa seca da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em quatro tipos de tratamentos, sendo TC<sub>1</sub> – densidade celular inicial 4,60.10<sup>4</sup> células ml<sup>-1</sup>, meio Chu; TC<sub>2</sub> – densidade celular inicial 6,48.10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, meio Chu; TCG<sub>1</sub> – densidade celular inicial 7,20.10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, e TCG<sub>2</sub> – densidade celular inicial 7,82.10<sup>4</sup> células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, não

observou diferença significativa entre os tratamentos, tendo estes uma produção de 0,82 g; 1,12 g; 0,97 g, e 0,92 g, respectivamente, em volumes de 20 mL de meio e 10 dias de cultivo.

No caso de efluente de cervejaria o extrato de levedura pode substituir as vitaminas necessárias ao desenvolvimento das microalgas (MIYAWAKI, 2010). Melhorando as características desta água residuária como um meio alternativo ao cultivo de microalgas.

#### 4.5 Teor de Lipídios

Segundo Pérez (2007), a quantidade de lipídios produzido pelas microalgas pode variar de 1% a 40% da matéria seca, e em determinadas condições de cultivo chegar a 85% da matéria seca. Também relata que condições de stress podem aumentar a quantidade de lipídios produzida.

Na tabela 10, verificou-se que houve diferença significativa para o teor de lipídios da microalga *Scenedesmus subspicatus* ao serem comparados os tratamentos. Como os dados originais apresentados eram em porcentagem, optou-se pela sua respectiva transformação em log X, para atender os requisitos da estatística paramétrica (normalidade da distribuição dos erros, homogeneidade das variâncias e aditividade dos fatores de variação). Os quais após Anava foram destransformados para serem apresentados.

Tabela 10 - Análise de variância do teor de lipídios da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada em meio MC e água residuária de cervejaria associados ou não a *Pseudonocardia nitrificans*.

CV	GL	SQ	QM	F calculado	F tabelado
Tratamento	3	0,4855	0,1618	65,44*	3,24
Resíduo	16	0,0396	0,0025		
Total	19	0,5251			

\* significativo pelo teste F a 5% de significância.

Os teores de lipídios podem ser observadas na tabela 11, onde o tratamento 4, água residuária de cervejaria, apresentou o maior teor de lipídios, 33,68%, podendo este ser associado a uma condição de estresse provocada pela relação não ideal das fontes de nitrogênio (íon amônio e nitrato) ou a um estado nutricional não adequado; seguido pelo tratamento 3, água residuária de cervejaria com *Pseudonocardia nitrificans*, com 22,81%, e

por último os tratamentos 1, meio MC com *Pseudonocardia nitrificans*, com 15,34% e 2, meio MC, com 13,36%, os quais não diferem estatisticamente, sendo inferiores aos demais.

Tabela 11 - Teor de lipídios da microalga *Scenedesmus subspicatus* cultivada em diferentes meios de cultivo: meio MC com *Pseudonocardia nitrificans* (tratamento 1), meio MC (tratamento 2), água residuária de cervejaria com *Pseudonocardia nitrificans* (tratamento 3), água residuária de cervejaria (tratamento 4).

Tratamento	Teor de lipídios (%)
4	33,68a
3	22,81b
1	15,34c
2	13,36c

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cunha (2011), avaliando quantidade de lipídios da microalga *Scenedesmus* sp. cultivada em diferentes tratamentos, sendo TC<sub>1</sub> – densidade celular inicial  $4,60 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu; TC<sub>2</sub> – densidade celular inicial  $6,48 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu; TCG<sub>1</sub> – densidade celular inicial  $7,20 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, e TCG<sub>2</sub> – densidade celular inicial  $7,82 \cdot 10^4$  células mL<sup>-1</sup>, meio Chu + 0,5 g L<sup>-1</sup> de glicose, também não observou diferença significativa entre os tratamentos, tendo estes uma produção de lipídios de 9,75%; 6,16%; 9,48%, e 9,67%, respectivamente, em volumes de 20 mL de meio e 10 dias de cultivo.

No tratamento 3, constituído por água residuária bruta de cervejaria associada com *Pseudonocardia nitrificans*, a microalga *Scenedesmus subspicatus* apresentou uma produtividade de biomassa de  $0,4023 \text{ g L}^{-1} \text{ semana}^{-1}$ , com um teor de lipídios de 22,81%, podendo produzir 209.196 kg de biomassa ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, ou 47.717,61 kg de lipídios ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

## 5 CONCLUSÕES

A água residuária de cervejaria foi caracterizada conforme metodologia proposta, apresentado concentrações de nutrientes capazes de substituir meios artificiais para cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus*, com vantagens econômicas, pois não apresentam custos, e vantagens ambientais, pois além de produzirem biomassa as microalgas removem nutrientes da água residuária, os quais poderiam provocar um impacto ambiental no corpo receptor.

A melhor concentração da água residuária de cervejaria para o cultivo da microalga *Scenedesmus subspicatus* foi de 100%, associado a maior concentração também do microrganismo nitrificante, no caso a *Pseudonocardia nitrificans*, apresentando a maior velocidade específica de crescimento, demonstrando a possibilidade do uso desta microalga associada com este microrganismo como alternativa ao tratamento de águas residuárias de cervejaria, substituindo unidades tradicionais, com a vantagem de produzir biomassa.

A microalga *Scenedesmus subspicatus* apresentou uma produtividade de biomassa de 0,4023 g L<sup>-1</sup> semana<sup>-1</sup> no tratamento 3, constituído de 100% água residuária de cervejaria associada com *Pseudonocardia nitrificans*, com um teor de lipídios de 22,81%, podendo produzir 209.196 kg de biomassa ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, ou 47.717,61 kg de lipídios ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

A partir destes resultados será requerida a proteção intelectual, patente, pois esta tecnologia traz uma solução técnica a um problema existente, e apresenta os requisitos de novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Além desta aplicação também serão desenvolvidos produtos para tratamento de sementes a base de *Pseudonocardia nitrificans*, pois esta além de oxidar as formas nitrogenadas, melhorando suas relações e disponibilidade para as plantas, também apresenta efeito fitossanitário. E produtos para uso associados com adubos orgânicos ou organominerais, os quais auxiliam na degradação da matéria orgânica e oxidação das formas nitrogenadas, melhorando suas relações e disponibilidade para as plantas, também podendo apresentar efeito fitossanitário.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. M. Aspectos microbiológicos de los procesos de nitrificación-desnitrificación. In: Taller y seminario latino americano tratamiento de aguas residuales, 3, 1994, Montevideo. **Anais...** Montevideo: Universidad de la Republica, 1994. p.55-63.

Algoteca de Coimbra – ACOI. Image Gallery. Disponível em:<<http://acoi.ci.uc.pt/imagem.php?id=2356&tp=3>>. Acesso em: Acesso em 23 de jan 2013.

ARCEIVALA, S. J. **Wastewater treatment and disposal – engineering and ecology in pollution control**. New York: Marcel Dekker, 1981. 892p.

BARSANTI, L.; GUATIERI, P. **Algae – Anatomy, biochemistry, and biotechnology**. New York: CRC Press, 2006. 301p.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, 242p.

BENEMANN, J. R. CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae system. *Energy conversion management*, 38, p. 475-479, 1997.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. (organizadores). **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. 2<sup>o</sup> ed. São Carlos: RiMa, 2006. 502p.

BUCKERIDGE, M. S.; MORTARI, L. C. ; MACHADO, M. R. Respostas fisiológicas de plantas às mudanças climáticas: alterações no balanço de carbono nas plantas podem afetar o ecossistema?. IN: REGO, G. M.; NEGRELLE, R. R. B; MORELLATO, L. P. C. **Fenologia - Ferramenta para conservação e manejo de recursos vegetais arbóreos** (Editores Técnicos). Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2008.

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

CARLSSON, A. *et al.* **Micro and macroalgae: utility for industrial applications**. CPL press, 2007.

CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA – CENBIO. Banco de Dados de Biomassa no Brasil, 2012. Disponível em: <<http://infoener.iee.usp.br/cenbio/biomassa.htm>>. Acesso em 02 fev. 2012.

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

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização do nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 467-475, 2006.

CUNHA, V. P. **Crescimento, clorofila e lipídios da microalga *Scenedesmus***. Blumenau, 2011. 15 f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Regional de Blumenau - URB.

DIMITROV, K. Green fuel technologies: a case study for industrial photosynthetic energy capture. 2007.

DINIS, M. A. P.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de Águas Residuais: O Papel das Microalgas. **Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, Universidade Fernando Pessoa, 1, p. 41-54; 2004.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química nova**, v. 28, n. 1, São Paulo, 2005.

FERREIRA, E. Cinética química e fundamento dos processos de nitrificação e desnitrificação biológica. In: Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental, 27, 2000, Porto Alegre. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2000. 1 CD room.

GUERREIRO, L. Efluente em cervejaria. Resposta técnica. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2006.

GRIMA, E. M. *et al.* Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale-up. **Journal of Biotechnology**. v. 70, n. 1-3, p. 231-247, 1999.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. 2013. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <<http://www.algaebase.org>>; Acesso em 23 de jan 2013.

IANNICELLI, A. L. **Reaproveitamento energético do biogás de uma indústria cervejeira**. Taubaté, 2008. 83f. Dissertação (mestrado). Universidade de Taubaté.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE IPCC 2001: Climate Change 2001: The Scientific Basis-Contribution of Working Group 1 to the IPCC Third Assessment Report. Cambridge Univ. Press. 2001.

JACOB-LOPES, E. *et al.* Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, 48, p. 306-310. 2009.

KOCHENBORGER, G. **Tratamento físico-químico para efluente de cervejaria**. Passo Fundo, 2012. 41f. Monografia (Engenharia Ambiental) - Universidade de Passo Fundo.

KWANG-YONG, L.; CHOUL-GYUN, L. Nitrogen removal from wastewater by microalgae without consuming organic carbon source. **Journal of microbiology and biotechnology**. v. 12, p. 979-985, 2002.

LAZZARETTI, E.; CAMPOS, A. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Efeito da adição de microrganismos (bioaumento) em uma estação de tratamento de efluentes por lodo ativado em

uma indústria de papel e celulose. XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2000.

LEAL, C. L.; LEAL, L. V. M. O biocombustível do Brasil. **Revista novos estudos**, n 78, 2007.

LI, S. *et al.* Pseudonocardians A–C, New Diazaanthraquinone Derivatives from a Deep-Sea Actinomycete *Pseudonocardia* sp. SCSIO 01299. **Mar. Drugs**, 2011, v. 9, p. 1428-1439; doi:10.3390/md9081428

MACÊDO, J. A. B. Programa de bioaugmentação (bioaugmentation), uma tecnologia avançada para tratamento de efluentes laticínios. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, jul/ago 2000, p. 47-52.

MIYAWAKI, B. Adaptação de meios de cultivo autotróficos para crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. Com foco no aumento da produtividade de biomassa e diminuição de custos. XIV Seminário de pesquisa. Universidade Tuiuti do Paraná. 2010.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalga visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1038-1042, 2008.

NASCIMENTO, R. D. M. *et al.* O. Avaliação de crescimento da microalga *Scenedesmus subspicatus* através de diferentes formulações no seu cultivo. In: XI Jornada de Ensino, Pesquisa e Exsão JEPEX, UFRPE: Recife, 2011.

OSWALD, W. S. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, L. J. (ed.). **Microalgal biotechnology**. Cambridge University Press, 12, p. 305-328. 1988.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003. 68 p.

PEREIRA FILHO, S. M. *et al.* Matéria-prima do biodiesel com curto tempo de coleta: microalga (*Scenedesmus subspicatus*). II Seminário biodiesel fonte de energias das oleaginosas em Pernambuco: Evolução do cenário e novas perspectivas no Brasil. Recife, 2010. Disponível em: <<http://www.apcagronomica.org.br/seminario2010/Posterres.htm>>. Acesso em: 25 de Nov. de 2012.

PÉREZ, H. E. B. **Biodiesel de microalgas**. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. São Paulo. 2007. 19p.

POULSEN, M. *et al.* Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Environmental Microbiology Reports**, 2010. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00098.x.

QUEVEDO, C. O.; MORALES, S. P. V.; ACOSTA, A. C. Crecimiento de *Scenedesmus* sp em diferentes medios de cultivo para la produccion de proteina microalgal. **VITAE – Revista de la facultad de química farmacêutica**. Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia. v. 15, n. 1, p. 25-31. 2008.

RAIMUNDO, R. S.; RIZZO, A. C. L.; TRINDADE, P. V. O. Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no tratamento de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. 26º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ – 2003.

REBELLO, F. F. P. Produção de Cerveja. **Revista agrogeoambiental**. p. 145-155. 2009.

ROSA, J. Programa de bioaumentação para aplicação em processos biológicos de tratamento de águas e resíduos orgânicos em geral. **Revista nacional da carne**, n. 223, p. 48-50, set. 1995.

ROSALES, P. F. *et al.* Estudo comparativo do teor lipídico de quatro diferentes microalgas para produção de biodiesel. XIX CIC, 2010.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Lisboa, 2011. 97f. Dissertação (mestrado). Universidade Nova de Lisboa.

SANTOS, M. S. Cervejas e refrigerantes / Mateus Sales dos Santos (ed.) Flávio de Miranda Ribeiro. São Paulo : CETESB, 2005. 58 p.

SEELIGER, U.; CORDAZZO, C. V. Métodos de cultivo de algas marinhas bentônicas em laboratório. **Atlântica**, Rio Grande, v. 1, p. 1-7, 1980.

SINDICERV - Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. **Mercado**. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br>>. Acesso em: 15 janeiro 2013.

SOBRAL, L. **Os países que mais bebem e produzem cerveja**. Exame.com. Home/Economia. Ranking 31/07/2012 8:00h. 2012. Disponível em <<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/os-paises-que-mais-bebem-e-produzem-cerveja#7>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2013.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. APHA, AWAA, WPCF. Washington D.C., American Public Health Association. 20<sup>th</sup> edition. 1998.

SURAMPALLI, R. Y. *et al.* Nitrification, denitrification and phosphorus removal in sequential batch reactors. **Bioresource technology**. Oxford, v. 61, n. 2, p. 151-157, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TEIXEIRA, C. M. L. L.; MORALES, E. Microalga como matéria-prima para a produção de biodiesel. In: I Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel, 2006, Brasília. **Anais...** 2006, Brasília, DF: MCT/ABIPTI, p. 91-96.

UEHARA, M. Y. **Operação e manutenção de lagoas anaeróbias e facultativas**. São Paulo: Cetesb, 1989. 91p.

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina. O cultivo de microalgas do laboratório de moluscos marinhos LMM. 2010.

VASCONCELLOS, G. F. **Biomassa: A eterna energia do futuro**. São Paulo: Senac, 2002. 142 p.

VICHEZ, C. *et al.* Microalgae mediated chemicals production and waste removal. **Enzyme microbial technology**, 20, p. 562-572. 1997.

VILLASMIL, T. **Aislamiento, Identificación y cultivo de cianobacterias presentes en la Laguna Gato Negro, Municipio Maracaibo, Estado Zulia**. La Universidad del Zulia. Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela, 2004. 90p.

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