

CULTIVO EM CONSÓRCIO DAS MICROALGAS *Spirulina platensis* E *Scenedesmus obliquus* COM ADIÇÃO DE EFLUENTE DE BOVINOCULTURA

CULTIVATION OF THE MICROALGAE *Spirulina platensis* AND *Scenedesmus obliquus* IN CONSORTIUM ADDING BOVINE CULTURE EFFLUENT

Vítor Augusto Farina Cavanhi¹, André Bergoli¹, João Felipe Freitag², Francisco Gerhardt Magro³, Luciane Maria Colla^{3*}

¹Curso de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Bairro São José, 99001-970 - Passo Fundo - RS - Brasil.

E-mail: vitor.a.f.c@hotmail.com; andre-bergoli@hotmail.com

²Curso de Engenharia Ambiental, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Bairro São José, 99001-970 - Passo Fundo - RS - Brasil.

E-mail: joaofrtg1@gmail.com

³Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, BR 285, Bairro São José, 99001-970 - Passo Fundo - RS - Brasil.

E-mail: chicomagro2@hotmail.com, lmcolla@upf.br*

* Autor para correspondência.

RESUMO

As microalgas apresentam-se como potencial matéria-prima para diversos produtos, visto suas composições intracelulares variadas, abrangendo áreas como a alimentícia, farmacêutica e cosmética. No contexto das biorrefinarias integradas, podem contribuir para o aumento da sustentabilidade ambiental de certos processos, sendo um exemplo a possibilidade de tratamento de efluentes e posterior utilização da biomassa gerada para a produção de biocombustíveis e/ou biofertilizantes, abrangendo também a bioeconomia, em virtude da melhoria da viabilidade econômica desses processos. Objetivou-se avaliar se as condições de cultivo microalgal das microalgas *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus* em consórcio, com e sem adição de efluente de bovinocultura proveniente de processo de biodigestão de esterco bovino, influenciam na composição química da biomassa quanto aos teores de carboidratos e proteínas. Ainda, buscou-se verificar as concentrações de fósforo total e DQO (Demanda Química de Oxigênio) nos meios de cultivo, a fim de verificar se os cultivos microalgais contribuem na valoração do efluente através do uso dos nutrientes presentes para geração de biomassas. A adição de efluente na concentração de 10% não influenciou significativamente na composição química da biomassa em termos de carboidratos e proteínas, quando comparado ao cultivo sem adição de efluente. Não foi observada redução das concentrações de fósforo total e DQO do meio de cultura adicionado de efluente, uma vez que o efluente era adicionado periodicamente. As biomassas obtidas poderiam ser aplicadas para a produção de biofertilizantes e biogás, entretanto não se aplicariam à produção de bioetanol, em função das composições químicas em proteínas e carboidratos observadas.

Palavras-chave: Sustentabilidade, biorrefinarias, bioprodutos, valoração de resíduos.

ABSTRACT

Microalgae are presented as a potential raw material for several products, given their varied intracellular compositions, covering sectors such as food, pharmaceuticals and cosmetics industries. In the context of integrated biorefineries, they can contribute to increasing the environmental sustainability of certain processes, an example being the possibility of effluent treatment and subsequent use of the obtained biomass for production of biofuels and/or biofertilizers, encompassing also the bioeconomy concept, due to the improvement of the economic viability of these processes. The aim of this study was to evaluate if the conditions of microalgal cultivation of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus obliquus* in consortium, with and without addition of bovine culture effluent from bovine manure biodigestion, can influence the chemical composition of biomass regarding carbohydrates and proteins. Furthermore, the concentrations of total phosphorus and COD (Chemical Oxygen Demand) in the culture media were analyzed, in order to verify whether microalgal cultures contribute to the valuation of the effluent through the use of its nutrients for biomass generation. The addition of effluent at a concentration of 10% did not significantly influence the chemical composition of the biomass regarding

carbohydrates and proteins, when compared to cultivation without the addition of effluent. There was no reduction in the concentrations of total phosphorus and COD in the culture medium added with effluent, since the effluent was added periodically. The biomass obtained could be applied for the production of biofertilizers and biogas, however it could not be applied for the production of bioethanol, due to the chemical composition of proteins and carbohydrates observed.

Keywords: Sustainability, biorefineries, bioproducts, waste valuation.

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo desenvolvimento sustentável tem trazido foco às biorrefinarias, as quais consistem no uso de matérias-primas renováveis em processos produtivos que não gerem resíduos, ou que esses resíduos sejam mínimos ao final do processo. As biorrefinarias permitem, além de uma produção sustentável com uma geração reduzida de resíduos e gases poluentes, a obtenção de diversos produtos, entre eles: biocombustíveis, biofertilizantes, alimentos funcionais ou ingredientes nutracêuticos, matérias-primas para a obtenção de fármacos, entre outros (Cherubini, 2010; Fernando et al., 2006). Como potencial matéria-prima para biorrefinarias encontram-se as microalgas, as quais são microrganismos fotossintéticos. Estas microalgas podem ter suas composições químicas modificadas em função da manipulação das condições nutricionais dos meios e das condições ambientais dos cultivos, permitindo seu uso para a produção de diversos produtos, o que pode diminuir os impactos dos elevados custos dos cultivos microalgais (Astolfi et al., 2020; Prétat et al., 2020; Zhu, 2015).

As microalgas têm sido usadas por populações antigas há séculos devido aos benefícios alimentares que apresentam, e vem retornando desde a década de 1960 a se destacar como alimentos considerados benéficos para a saúde, e em usos em áreas como a farmacêutica e cosmética (Zhu, 2015; Bertoldi; Sant’Anna; Oliveira, 2008; Richmond et al., 1993). Porém, o cultivo de microalgas apresenta elevados custos, o que dificulta seu uso em escala industrial para os fins aos quais tem potencial e cujos produtos gerados apresentam mais baixo valor agregado, como os biocombustíveis de terceira geração (Abdullah et al., 2019; Prétat et al., 2020; Zhu, 2015). Nesse âmbito, surge a busca por diminuir custos de cultivo, sendo o meio de cultivo uma parcela considerável dos custos, meios de cultivo alternativos são alvos de diversos estudos, entre eles o uso de efluentes (Hultberg et al., 2017; Mahdy et al., 2015; Zeng et al., 2015).

O uso de efluentes das mais diversas origens é relatado em diversos estudos visando o cultivo de microalgas (Ansari et al., 2019; Hultberg et al., 2017; Markou, 2015; Paddock, Fernández-Bayo, Vandergheynst, 2019). Esse uso traz duas vantagens estratégicas para o cultivo microalgal: com a adição de efluente, consequente aumento da carga orgânica, e limitação de nutrientes, ocorre estresse celular, levando assim, a microalga a acumular compostos de reserva, como os carboidratos, essenciais para a produção do biocombustível bioetanol (Salla et al., 2016). A outra vantagem é a possibilidade de tratamento do efluente, devido à microalga utilizar como nutrientes certos compostos presentes no efluente, como fósforo e nitrogênio inorgânicos. Além de que a cooperação entre microrganismos já presentes no efluente e a microalga, pode trazer benefícios para o cultivo, como o aumento da produção de biomassa e remoção dos compostos mencionados anteriormente (Mahdy et al., 2015; Wang et al., 2020). Outra cooperação, que também traz benefícios, pode ser obtida por cultivos em consórcio utilizando mais de uma espécie de microalga (Huy et al., 2018; Koreivienė et al., 2014), o que diminui os riscos de toxicidade causados pelos efluentes para os microrganismos. O uso de cultivos descontínuos alimentados permite a adição das fontes orgânicas de nutrientes (nesse caso os efluentes) aos poucos durante os cultivos, evitando os processos de toxicidade às células.

Assim, o uso de microalgas cultivadas com efluentes no contexto das biorrefinarias, tem potencial para a redução de custos do cultivo e obtenção de biocombustíveis algais, proporcionando assim, um processo ambientalmente sustentável e viável economicamente (Xin et al., 2016; Zhu, 2015). Objetivou-se avaliar o consórcio microalgal de *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus*, cultivado em modo descontínuo alimentado, em meios com adição de efluente de bovinocultura, verificando-se

os efeitos nas composições químicas das biomassas obtidas e na redução da carga orgânica dos efluentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo Microalgal

O cultivo foi realizado em batelada alimentada com as microalgas *Spirulina platensis* LEB 52 e *Scenedesmus obliquus*, cujos inóculos foram mantidos pelo Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos do Campus I da Universidade de Passo Fundo. O efluente de bovinocultura foi proveniente de processo de biodigestão de esterco bovino para geração de energia em uma propriedade da cidade de Vacaria (RS). Foram utilizados tanques do tipo *raceway* de 10 L cada, sendo o cultivo conduzido na estufa localizada no Parque Científico e Tecnológico da Universidade de Passo Fundo (coordenadas geográficas: 28°13'40.0"S 52°23'23.7"W), com controle de temperatura entre 20 e 30 °C. Os inóculos da *S. platensis* e *S. obliquus* foram adaptados nas condições da estufa de cultivo, em função das condições próprias de luminosidade natural e temperaturas mencionadas anteriormente. Após a adaptação dos inóculos, os cultivos foram iniciados em quatro tanques *raceway* com concentração microalgal total de aproximadamente 0,1 g/L, com adição de 10% (v/v) de efluente (Magro et al., 2021) em dois dos tanques (descontínuo alimentado), enquanto em outros dois tanques não foi adicionado efluente (descontínuo simples), visando a avaliação da influência do efluente nos cultivos. O volume restante foi completado com meio de cultivo Zarrouk na concentração de 20% (Zarrouk, 1966). A agitação dos tanques foi realizada por bombas submersas de 5 W cada.

O cultivo foi conduzido durante 20 dias, com encerramento quando os mesmos atingiram a fase de declínio ou morte celular. Diariamente, foi realizada a análise de pH, e a cada cinco dias foram coletadas amostras para a determinação de massa seca. Amostras também foram retiradas e centrifugadas, separando-se o sobrenadante e os sólidos, os quais foram congelados para determinações das concentrações de DQO e fósforo no sobrenadante, e da composição em carboidratos e proteínas das biomassas. Após a coleta dessas amostras foram adicionados 1 L (10%) de efluente, previamente filtrado em algodão, nos tanques com os cultivos com efluente, nos tempos 5, 10 e 15 dias, com exceção do 20º dia, quando foi encerrado o cultivo, e no dia 0 foi adicionado efluente anteriormente à coleta de amostra.

2.2. Determinações Analíticas

O pH foi determinado em peagâmetro (Digimed DM-22). A massa seca foi determinada por filtração de volume conhecido de amostra em membranas de celulose 0,45 µm usando sistema Millipore.

As biomassas coletadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20 por centrifugação, foram secas em estufa por 24 h a 50 °C e submetidas ao rompimento celular por sonicação em disruptor de células ultrassônico de 550 W, durante 5 min. Posteriormente, foram caracterizadas quanto aos teores de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956) e proteínas pelo método Folin-Lowry (Lowry et al., 1951). Os sobrenadantes coletados foram caracterizados quanto à demanda química de oxigênio (DQO) por titulação e fósforo total (APHA, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Acompanhamento dos cultivos

As Figuras 1 e 2 apresentam a variação dos valores de pH ao longo do cultivo e as concentrações de massa seca, respectivamente. O pH se manteve alcalino durante todo o cultivo, o que é esperado visto a composição alcalina do meio (Zarrouk, 1966), e ocorreu o crescimento das microalgas juntamente com a elevação do pH, enfatizando o melhor crescimento de microalgas em pH elevado (Perez-Garcia et al., 2011). O decréscimo do pH no final do cultivo sem efluente pode estar associado ao consumo de nutrientes que conferem caráter alcalino ao meio (bicarbonato de sódio, nitrato de sódio e cloreto de cálcio). O pH do cultivo com efluente manteve-se estável, em função da adição periódica de efluente, que apresentava pH $7,24 \pm 0,02$, diminuindo assim o pH do meio em relação aos cultivos realizados sem efluente.

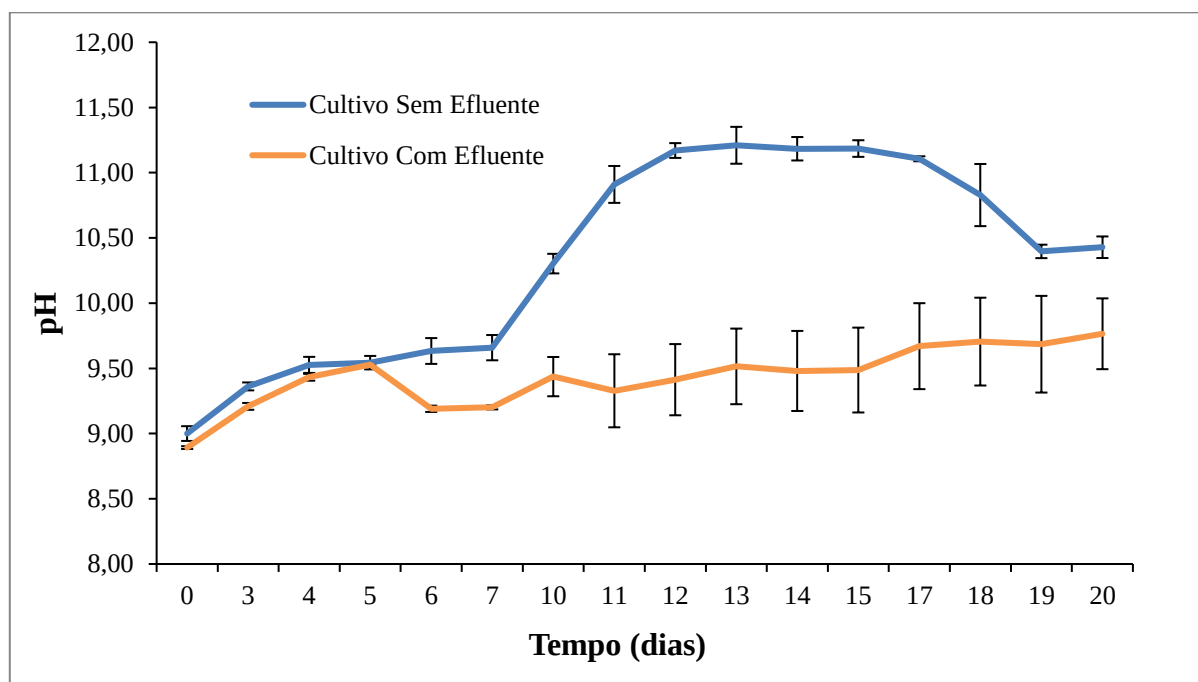


Figura 1: pH ao longo dos cultivos das microalgas em consórcio em reatores operados com e sem adição de efluentes.

Os cultivos sem efluente atingiram valores maiores de massa seca, comparados aos cultivos com efluente (Figura 2), isso pode ser devido ao estresse celular causado pelo efluente, que pode ter levado a um crescimento menor da microalga. A máxima concentração foi obtida no cultivo sem efluente ($1,0545 \pm 0,0026$ g/L) no tempo de 15 dias, enquanto para o cultivo com efluente as concentrações obtidas foram inferiores ($0,4794 \pm 0,0631$ g/L) para o mesmo tempo de cultivo. A diferença nas concentrações de massa seca iniciais entre os dois tipos de cultivo pode ser devido aos sólidos presentes no efluente, que podem ficar retidos no filtro, assim, influenciando no resultado. Observa-se uma redução da concentração inicial de massa seca no cultivo com efluente, indicando um efeito de toxicidade ocasionado pela adição do efluente ao meio desde o tempo inicial dos cultivos. Após 5 dias, houve uma readaptação das células, que permitiu atingir as concentrações mencionadas.

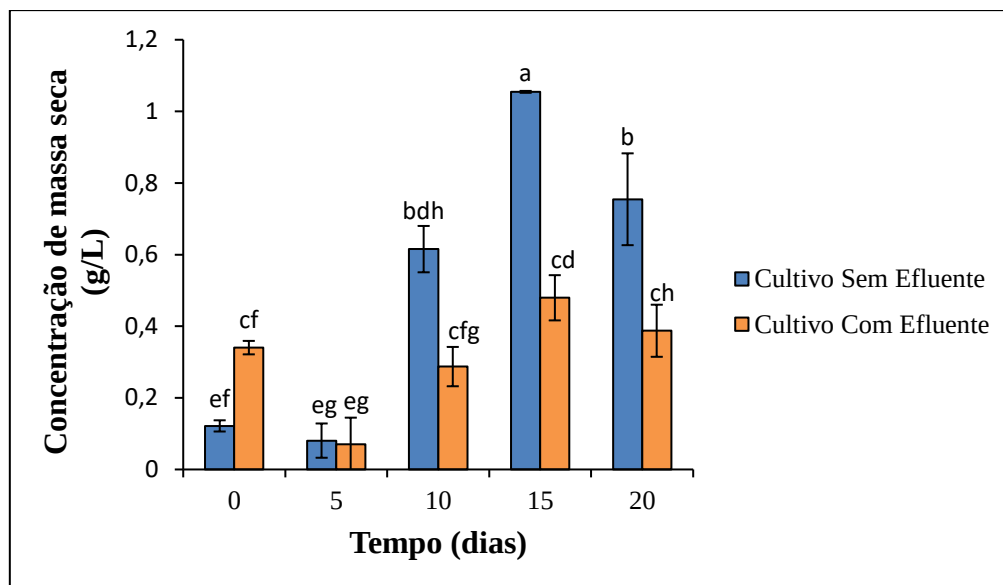


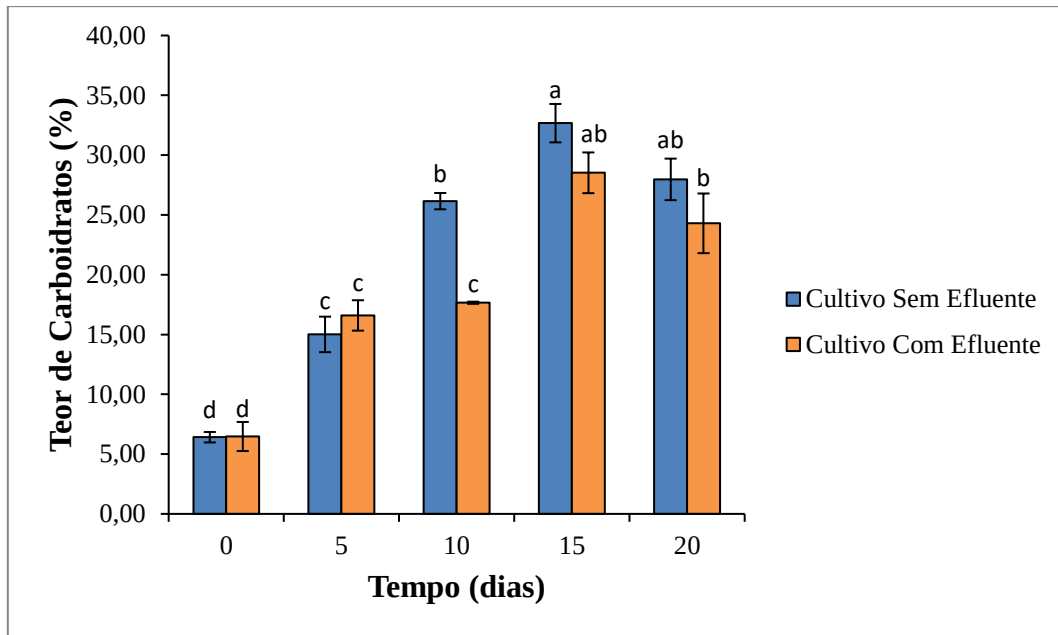
Figura 2: Massa seca (g/L) ao longo dos cultivos.

Colunas que compartilham de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

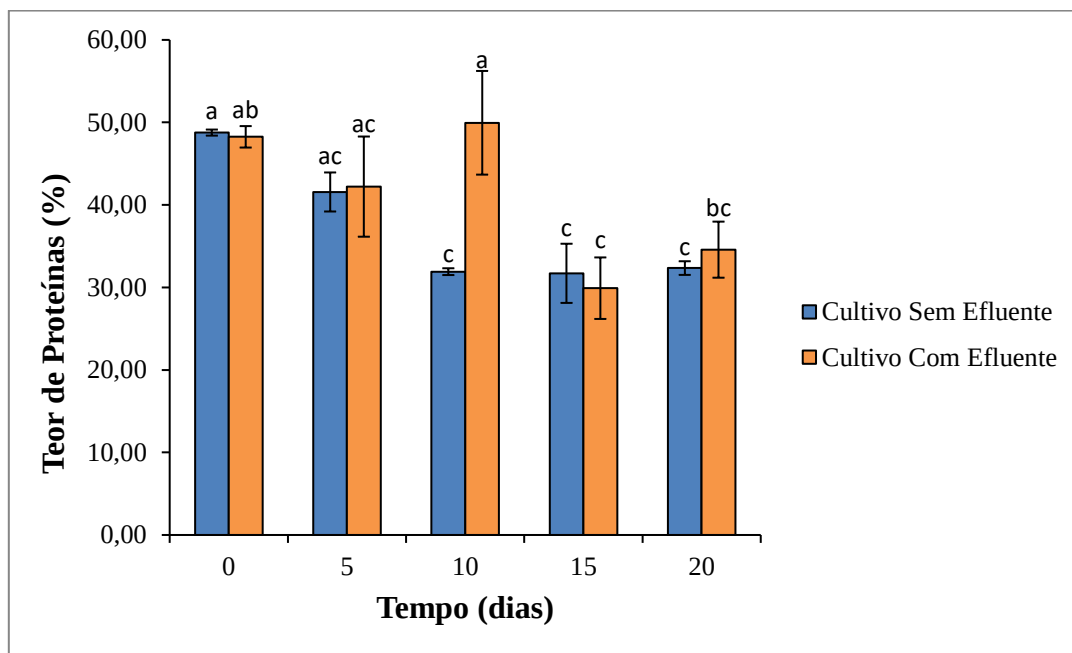
3.2. Teores de carboidratos e proteínas nas biomassas

A Figura 3 apresenta a variação dos teores de carboidratos e proteínas ao longo dos cultivos com e sem efluente. No tempo de 10 dias, observa-se que os teores de carboidratos das biomassas dos cultivos realizados com e sem efluente foram diferentes entre si. A maior concentração de carboidratos intracelular foi obtida no tempo de 15 dias ($32,67 \pm 1,61\%$ no cultivo sem efluente e $28,52 \pm 1,70\%$ no cultivo com efluente). Em relação aos tempos iniciais e finais (0 e 20 dias), observa-se aumento nos teores de carboidratos intracelulares, de aproximadamente 6,4% no dia 0 para em torno de 24-27% no tempo de 20 dias. Assim, a adição de efluente durante o cultivo, nas condições estudadas, não exerceu efeito significativo no acúmulo de carboidratos intracelulares, obtendo-se uma elevação de carboidratos intracelulares em ambos os cultivos.

Em relação aos teores de proteínas das biomassas (Figura 3b), observa-se uma redução ao longo do tempo com exceção para o experimento adicionado de efluente no tempo de 10 dias. Assim, os teores de proteínas das biomassas nos cultivos com e sem efluente foram estatisticamente iguais, analisando-se um mesmo tempo de cultivo, com exceção do tempo de 10 dias. A adição de efluente durante o cultivo, nas condições estudadas, não exerceu efeito significativo no acúmulo de proteínas intracelulares.



(a)



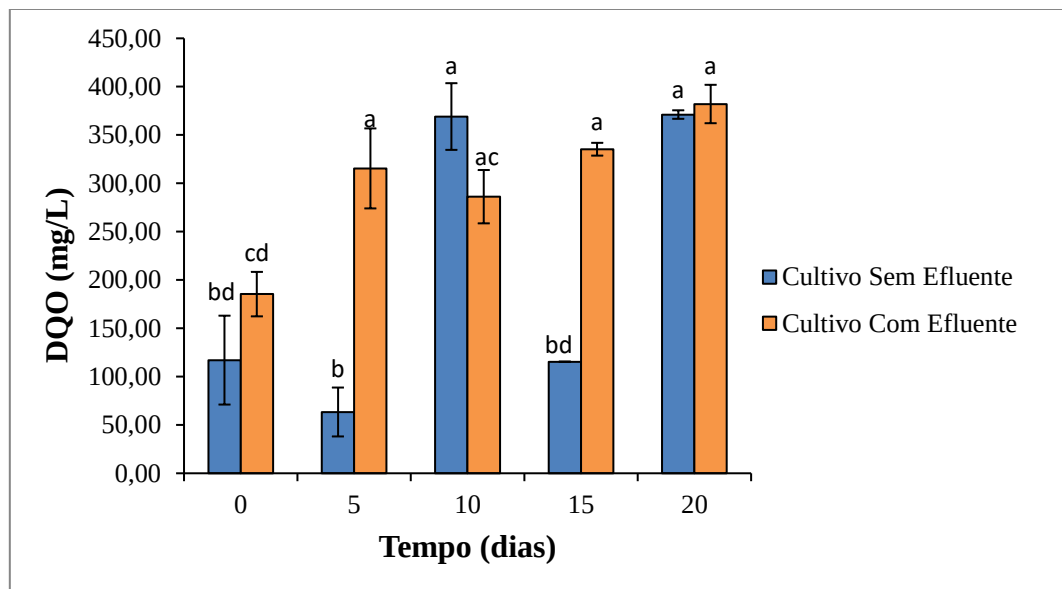
(b)

Figura 3: Teores de (a) carboidratos (%) e (b) proteínas (%) nas biomassas obtidas em diferentes tempos de cultivo. Colunas que compartilham de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

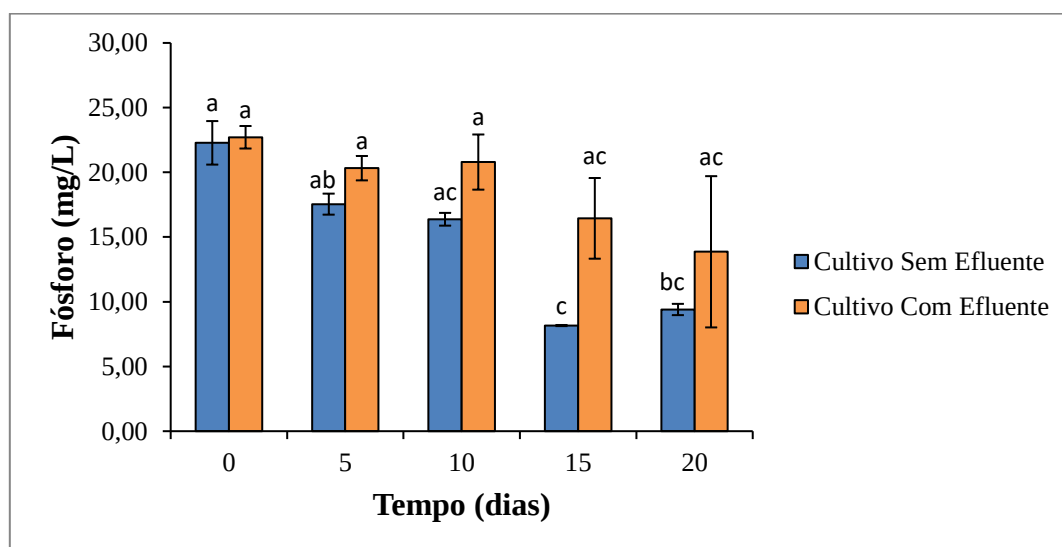
3.3. Determinações de DQO e fósforo durante os cultivos

A Figura 4 apresenta os resultados das análises da demanda química de oxigênio (DQO) e fósforo total. Os cultivos apresentaram resultados de matéria orgânica (DQO) estatisticamente iguais no tempo inicial, indicando que a adição de 10% de efluente não alterou significativamente esses valores. Observa-se que ocorreu um aumento de DQO entre os dias 0 e 5 no cultivo com efluente, mantendo-se estável nos dias posteriores. Provavelmente o aumento de DQO seja devido à morte celular

de parte das células em função da toxicidade do efluente. Os resultados de DQO nos cultivos sem efluente variaram de forma aleatória ao longo do tempo, podendo indicar da mesma forma que os cultivos não apresentavam-se estáveis, podendo significar morte celular. A concentração de biomassa não segue o mesmo padrão, uma vez que a determinação por massa seca não diferencia células vivas e mortas. Ainda, podem ter ocorridos erros analíticos na determinação de DQO.



(a)



(b)

Figura 4: (a) DQO (mg/L) e (b) Fósforo (mg/L) dos sobrenadantes dos cultivos ao longo do tempo. Colunas que compartilham de uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey a 5% de significância.

Em relação às análises de fósforo total (Figura 4b), ao longo dos cultivos foram observados alguns aspectos, como a redução da concentração no cultivo sem efluente e concentrações estatisticamente iguais durante o cultivo com presença de efluente. Uma vez que realizou-se a adição de efluente a cada 5 dias (contendo de 3,09 mg/L de fósforo), esse comportamento padrão pode ser devido a isso, o que indica que o microrganismo estava consumindo fósforo, mas em função da adição de efluente em batelada alimentada, esse consumo não é observado ao longo do tempo. A presença de fósforo em ambos os cultivos pode ser devida a presença deste composto no meio Zarrouk.

4. CONCLUSÃO

Sabe-se que a aplicabilidade por vias biotecnológicas das microalgas é promissora, visto principalmente os biocombustíveis com simultâneo tratamento de efluentes. Dentre as conclusões do presente trabalho, observa-se principalmente a adaptabilidade das cepas de *S. platensis* e *S. obliquus* ao efluente de bovinocultura proveniente de processo de biodigestão de esterco bovino. Entretanto, a adição de 10% de efluente no tempo inicial dos cultivos com efluente ocasionou efeito de toxicidade aos microrganismos, impedindo a avaliação exata dos efeitos de um cultivo em batelada alimentada em comparação à batelada simples. Não foi possível diferenciar os cultivos também em relação à remoção de DQO e fósforo, uma vez que foi sendo realizada adição de efluente ao longo do tempo nos cultivos em batelada alimentada. No entanto, isso indica que esses nutrientes estavam sendo consumidos. A biomassa obtida poderia ser aplicada para a produção de bioprodutos que requeiram concentrações medianas de proteínas e carboidratos, como na produção de biofertilizantes e biogás, entretanto não se aplicariam à produção de bioetanol.

AGRADECIMENTOS

Evidenciamos e agradecemos o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) realizado através da bolsa de iniciação científica PIBIC/CNPq.

5. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, B.; MUHAMMAD, S. A. F. S.; SHOKRAVI, Z.; ISMAIL, S.; KASSIM, K. A.; MAHMOOD, A. N.; AZIZ, M. M. A. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 107, p. 37-50, 2019.

ANSARI, F. A.; RAVINDRAN, B.; GUPTA, S. K., NASR, M.; RAWAT, I.; BUX, F. Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, v. 240, p. 293–302, 2019.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2015.

ASTOLFI, A. L.; REMPEL, A.; CAVANHI, V. A. F.; ALVES, M.; DEAMICI, K. M.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Simultaneous saccharification and fermentation of *Spirulina* sp. and corn starch for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with high antioxidant activity. *Bioresource Technology*, v. 301, p. 122698, 2020.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. *B. CEPPA*, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.

CHERUBINI, F., The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v.51, p. 1412 - 1421, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERNANDO, S.; ADHIKARI, S; CHANDRAPAL, C.; MURALI, N. Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*, v. 20, p. 1727-1737, 2006.

HUY, M.; KUMAR, G.; KIM, H. W.; KIM, S. H. Photoautotrophic cultivation of mixed microalgae consortia using various organic waste streams towards remediation and resource recovery. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 576–581, 2018.

HULTBERG, M.; LIND, O.; BIRGERSSON, G.; ASP, H. Use of the effluent from biogas production for cultivation of *Spirulina*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, p. 625-631, 2017.

KOREIVIENĖ, J.; VALČIUKAS, R.; KAROSIENĖ, J.; BALTRĖNAS, P. Testing of *Chlorella/Scenedesmus* microalgae consortia for remediation of wastewater, CO₂ mitigation and algae biomass feasibility for lipid production. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, v. 22, p. 105–114, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGRO, F.G.; FREITAG, J.F.; BERGOLI, A.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Microalgae consortia for post-treating effluent of anaerobic digestion of cattle waste and evaluation of biochemical composition of biomass. *Bioenergy Research*, 2021.

MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 35-41, 2015.

MAHDY, A.; MENDEZ, L.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Algal culture integration in conventional wastewater treatment plants: Anaerobic digestion comparison of primary and secondary sludge with microalgae biomass. *Bioresource Technology*, v. 184, p. 236–244, 2015.

PADDOCK, M. B.; FERNÁNDEZ-BAYO, J. D.; VANDERGHEYNST, J. S. The effect of the microalgae-bacteria microbiome on wastewater treatment and biomass production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, p. 893-905, 2019.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, p. 11–36, 2011.

PRÉAT, N.; Taelman, S. E.; DE MEESTER, S.; ALLAIS, F.; DEWULF, J. Identification of microalgae biorefinery scenarios and development of mass and energy balance flowsheets. *Algal Research*, v. 45, p. 101737, 2020.

RICHMOND, A.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A.; KOPEL, R. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, p. 327–332, 1993.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. *Bioresource Technology*, v. 209, p. 133-141, 2016.

WANG, Y.; WANG, S.; SUN, L.; SUN, Z.; LI, D. Screening of a *Chlorella*-bacteria consortium and research on piggery wastewater purification. *Algal Research*, v. 47, p. 101840, 2020.

XIN, C.; ADDY, M. M.; ZHAO, J.; CHENG, Y.; CHENG, S.; MU, D.; LIU, Y.; DING, R.; CHEN, P.; RUAN, R. Comprehensive techno-economic analysis of wastewater-based algal biofuel production: A case study. *Bioresource Technology*, v. 211, p. 584–593, 2016.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. 1966. Tese (Ph.D) - Université de Paris, Paris, 1966.

ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M. K.; ZHANG, S.; LU, Y.; SUN, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 1385–1392, 2015.

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