

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

LUCAS ALVES MAROUBO

**CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO SUÍNO BIODIGERIDO VISANDO AO
TRATAMENTO DESTES EFLUENTE E À PRODUÇÃO DE BIOMASSA APLICÁVEL
À CODIGESTÃO ANAERÓBIA**

São Carlos

2021

LUCAS ALVES MAROUBO

**CULTIVO DE MICROALGAS EM RESÍDUO SUÍNO BIODIGERIDO VISANDO AO
TRATAMENTO DESTES EFLUENTE E À PRODUÇÃO DE BIOMASSA APLICÁVEL
À CODIGESTÃO ANAERÓBIA**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências: Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof.^a Tit. Maria do Carmo Calijuri.

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

A356c Alves Maroubó, Lucas
 Cultivo de microalgas em resíduo suíno
 biodigerido visando ao tratamento deste efluente e à
 produção de biomassa aplicável à codigestão anaeróbia /
 Lucas Alves Maroubó; orientadora Maria do Carmo
 Calijuri. São Carlos, 2021.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
 Engenharia Hidráulica e Saneamento e Área de
 Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2021.

 1. Chlorella sorokiniana. 2. Tratamento biológico.
 3. Remoção de nutrientes. 4. Suinocultura. 5.
 Fitorremediação. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **LUCAS ALVES MAROUBO**.

Título da tese: "Cultivo de microalgas em resíduos suíno biodigerido visando ao tratamento deste efluente e à produção de biomassa aplicável à codigestão anaeróbia".

Data da defesa: 26/10/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri**
(Orientadora)

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic**

(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)

Aprovado

Profa. Dra. **Diva Souza Andrade**

(Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná/IDR-Paraná)

Aprovado

Prof. Dr. **André Cordeiro Alves dos Santos**

(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovado

Dr. **Paulo Vagner dos Santos**

(Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial/SENAI)

Aprovado

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Prof. Dr. **Luiz Antonio Daniel**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos e Lúcia, que sempre me apoiaram incondicionalmente para que meus sonhos se tornassem realidade; à minha irmã, Laís, pelas palavras de incentivo e consolo quando tudo parecia sem solução; e aos meus tios, Ary e Anna, que por meio do amparo e do bom exemplo, me guiaram para que eu trilhasse os caminhos do conhecimento.

Em especial, dedico a todos os pesquisadores e professores, iniciantes ou experientes que, mesmo diante de tantas dificuldades existentes no âmbito acadêmico, continuam resilientes atuando em prol de um futuro mais digno e justo a todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de São Carlos (ESSC) e ao Departamento de Engenharia Hidráulica e Saneamento (SHS), pelo fornecimento das estruturas físicas e de recursos humanos, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas concessões das bolsas de amparo a esta pesquisa (CAPES PROEX-0487, proc. 1632901; e CNPq, proc. 141991/2017-8). Tais recursos possibilitaram minha manutenção na universidade e permitiram minha participação em eventos científicos, cujos objetivos foram difundir os resultados parciais deste trabalho e possibilitar minha interação direta com profissionais da área, adquirindo experiências e abrindo novas oportunidades.

À minha orientadora Prof.^a Tit. Maria do Carmo Calijuri, por acreditar no meu trabalho, do início ao fim, confiar na minha capacidade e compartilhar seus conhecimentos com bastante empenho, respeito, paciência e integridade. Muito obrigado pela orientação, pelos esclarecimentos em situações de dúvidas e pelo apoio nos momentos em que surgiram desafios, principalmente quando estes pareciam ser insuperáveis.

Ao Prof. Tit. Marcelo Zaiat e ao Prof. Luiz Antonio Daniel, por terem me concedido acesso ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) e ao Laboratório de Tratamento Avançado e Reúso de Águas (LATAR), respectivamente. Sem vossa cooperação, seria muito mais difícil ter obtido bons resultados.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Helena Rissato Zamariolli Damianovic, que nunca hesitou em colaborar comigo todas as vezes em que precisei de seu auxílio. Sua colaboração foi, indiscutivelmente, como uma luz norteadora diante da obscuridade que o tema, muitas vezes, se apresentava a mim.

Aos demais professores e professoras do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento (PPG-SHS), pelos ensinamentos repassados por meio das disciplinas curriculares, certamente enriquecedores para a minha formação.

Aos membros da banca avaliadora, pelo aceite e disposição em ler este trabalho, na confiança de que irão avaliar e contribuir com discussões ricas e pertinentes ao tema estudado, possibilitando que seja produzido um material de qualidade.

Ao Carlos Alberto (Pé) e aos demais funcionários da Fazenda Santo Ignácio de Loyola, que me possibilitaram a realização de coletas de resíduo suíno e de amostras locais de água, materiais imprescindíveis para a confecção dos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Hidráulica e Saneamento (SHS), em especial à Adriana Cristina Poli Miwa, à Carolina Aparecida Sabatini Mirandola e à Maria Angela Tallarico Adorno pelo apoio técnico laboratorial e pela ajuda com a revisão dos métodos; ao Júlio Cesar Trofino, pelo auxílio na manutenção de equipamentos analíticos e orientações nas análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO); ao Bérghamo e ao Benê, por colaborarem com as coletas e transportes dos resíduos; ao Antonio Wagner Lamon, pela intensa e indispensável colaboração na instalação dos LEDs nas incubadoras, benfeitorias permanentes ao Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE).

Aos pós-graduandos e amigos do BIOTACE, companheiros diários de jornada, com os quais pude contar com a amizade, assistência e aprendizado no decorrer da pesquisa: Aline, Amanda, Andressa, Carolina Barbosa, Carolina Ferreira, Cristiane, Flávia, Henrique, Ingrid, Janaína, Karen, Laura, Munique, Murilo, Nícolas, Raphaella, Rômulo e Vinícius.

Agradeço profundamente ao Fellipe Moutinho, pela parceria constante nesta pesquisa através de reuniões, discussões, revisões e assistência na execução de análises. O compartilhamento de seus conhecimentos e seus julgamentos críticos contribuíram fortemente para que esta pesquisa obtivesse melhor nível de qualidade.

De modo especial, sou muito grato aos meus amigos de moradia Arlan Scortegagna, Bruno Barela e Wesley Saltarelli, pelas trocas de ideias, pelos momentos fraternos de risos e descontração e também pelo fundamental e constante apoio emocional.

Aos meus amigos das repúblicas 3pra1, Desanda, Disfarça e Zinabre e aos demais amigos que São Carlos me proporcionou. A companhia de vocês contribuiu significativamente para minimizar os momentos de tensão e exaustão decorrentes do cotidiano acadêmico.

Por último, mas não menos importante, à toda minha família, principalmente aos meus pais Marcos e Lúcia e à minha irmã Laís, pela compreensão quanto à minha ausência em muitas ocasiões em virtude de meus estudos e pelo apoio incondicional durante todo meu percurso.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

MAROUBO, Lucas Alves. **Cultivo de microalgas em resíduo suíno biodigerido visando ao tratamento deste efluente e à produção de biomassa aplicável à codigestão anaeróbia**. 2021. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

A atividade suinícola produz diversos benefícios econômicos, porém devido à grande quantidade de resíduos gerados, tem sido vista como forte ameaça ambiental. De outro lado, o cultivo de microalgas se mostra como uma alternativa que pode apresentar grande eficiência na remoção de nutrientes de águas residuárias e, concomitantemente, produzir biomassa de interesse a diferentes aplicações biotecnológicas. Sendo assim, a presente pesquisa propôs selecionar estirpes de microalgas de ambientes aquáticos e otimizar seu cultivo em resíduo suíno biodigerido (RSBio) visando à remoção de nutrientes, além de aplicar a biomassa gerada como substrato na codigestão anaeróbia do resíduo suíno bruto (RSBru), a fim de verificar seu impacto na produtividade de metano. Para tanto, esta pesquisa foi dividida em três etapas: (i) coleta e caracterização dos resíduos e das amostras de ambientes aquáticos; (ii) aclimatação e cultivo de microalgas em RSBio; e (iii) ensaio de biodegradabilidade anaeróbia e de codigestão de microalgas com RSBru. Ao final do ensaio de aclimatação, *Chlorella sorokiniana* se destacou como a espécie mais abundante e, portanto, foi isolada, por apresentar potencial para aplicação em processos de tratamento de águas residuárias. O ponto ótimo ($26\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $160\text{ }\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) considerando a amplitude de crescimento (A_c) serviu como condições de cultivo desta estirpe no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metab\u00f3litos. Foram observadas duas estrat\u00e9gias que direcionam as microalgas para objetivos distintos: a primeira delas, definida pelo cultivo na concentra\u00e7\u00e3o de 1×10^6 c\u00e9lulas mL^{-1} (RSBio10), objetiva aumentar a concentra\u00e7\u00e3o de biomassa (em 83,8%), de clorofila *a* (em 1.869,0%) e de lip\u00eddeos (em 361,2%); e a segunda, definida pelo cultivo na concentra\u00e7\u00e3o de 4×10^6 c\u00e9lulas mL^{-1} (RSBio40), tem pretens\u00e3o de reduzir as concentra\u00e7\u00f5es de DQO (em 69,3%), de nitrog\u00eanio amoniacal (em 77,6%) e de ortofosfato (em 39,0%) no substrato e, concomitantemente, proporcionar o incremento de prote\u00ednas (em 43,7%) e de carboidratos (em 564,4%) na biomassa das microalgas. O ensaio de biodegradabilidade revelou que o lodo do biodigestor, com ou sem adi\u00e7\u00e3o de microalgas, resultou em valores de produ\u00e7\u00e3o de metano superiores ao estimados com base na $\text{DQO}_{\text{inicial}}$. Foi identificada uma tend\u00eancia de aumento na produ\u00e7\u00e3o de metano com o aumento da densidade celular de microalgas. Entretanto, o ensaio de codigest\u00e3o revelou que n\u00e3o h\u00e1 efeito sin\u00e9rgico das microalgas juntamente ao RSBru. No tratamento sem in\u00f3culo de microalgas (RSBru0), foi estimado um potencial produtivo de mais de 8.000 NmL de metano, superior em 36,1% em rela\u00e7\u00e3o ao tratamento em que foram utilizadas densidades celulares de 4×10^6 c\u00e9lulas mL^{-1} (RSBru40) e em 65,5% em rela\u00e7\u00e3o ao tratamento com 6×10^6 c\u00e9lulas mL^{-1} (RSBru60). Ademais, RSBru0 apresentou a maior efici\u00eancia de consumo de DQO (99,7%), o que resultou na produ\u00e7\u00e3o de $155,1\text{ NmL CH}_4\text{ g STV}_{\text{aplicados}}^{-1}$. Em suma, a biodigest\u00e3o de RSBru (sem adi\u00e7\u00e3o de microalgas) ou a codigest\u00e3o deste res\u00edduo com *C. sorokiniana* na concentra\u00e7\u00e3o inicial de 4×10^6 c\u00e9lulas mL^{-1} podem ser sugeridas para alcan\u00e7ar remo\u00e7\u00e3o de DQO acima de 95% e produ\u00e7\u00e3o de mais de $120\text{ NmL CH}_4\text{ g STV}_{\text{aplicados}}^{-1}$.

Palavras-chave: *Chlorella sorokiniana*. Tratamento biol\u00f3gico. Remo\u00e7\u00e3o de nutrientes. Suinocultura. Fitorremedia\u00e7\u00e3o.

ABSTRACT

MAROUBO, Lucas Alves. **Cultivation of microalgae in biodigested swine wastewater for the treatment of this effluent and the production of biomass applicable to anaerobic co-digestion.** 2021. 134 p. Thesis (Doctorate in Sciences: Hydraulic Engineering and Sanitation). São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, 2021.

Pig farming produces several economic benefits, but due to the large amount of waste generated, it has been seen as a strong environmental threat. On the other hand, the cultivation of microalgae is shown as an alternative that can be highly efficient in removing nutrients from wastewater and, at the same time, produce biomass of interest for different biotechnological applications. Thus, the present research proposed to select microalgae strains from aquatic environments and to optimize their cultivation in biodigested swine wastewater (BSW) aiming at the removal of nutrients, in addition to applying the biomass generated as a substrate in the anaerobic co-digestion of the raw swine waste (RSW), with the intention of verifying its impact on methane productivity. To this end, this research was divided into three stages: (i) collection and characterization of waste and samples from aquatic environments; (ii) acclimatization and cultivation of microalgae in BSW; and (iii) anaerobic biodegradability and microalgae co-digestion test with RSW. At the end of the acclimatization test, *Chlorella sorokiniana* stood out as the most abundant species, with potential for application in wastewater treatment processes. The optimum point (26 °C and 160 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) considering the growth amplitude (G_A) served as conditions for the cultivation of this strain in the nutrient removal and biomass and metabolite production tests. Two strategies were observed that direct microalgae to different objectives: the first one, defined by cultivation at the concentration of 1.0×10^6 cells mL^{-1} (BSW10), aims to increase the concentration of biomass (by 83.8%), chlorophyll *a* to (in 1,869.0%) and lipids (in 361.2%); and the second, defined by cultivation at a concentration of 4.0×10^6 cells mL^{-1} (BSW40), aims to reduce the levels of COD (by 69.3%), ammoniacal nitrogen (by 77.6%), orthophosphate (in 39.0%) in the substrate and, concomitantly, provide an increase in proteins (in 43.7%) and carbohydrates (in 564.4%) in the microalgal biomass. The biodegradability test revealed that the sludge from the biodigester, with or without the addition of microalgae, resulted in higher methane production values than those estimated based on the initial COD. A trend towards an increase in methane production was identified with the increase in microalgae cell density. However, the co-digestion test revealed that there is no synergistic effect of microalgae with RSW. In the treatment without microalgae inoculum (RSW0), a productive potential of more than 8,000 NmL of methane was estimated, 36.1% higher than the treatment in which cell densities of 4×10^6 cells mL^{-1} were used (RSW40) and 65.5% higher than the treatment with 6×10^6 cells mL^{-1} (RSW60). Furthermore, RSW0 showed the highest COD consumption efficiency (99.7%), which resulted in the production of 155.1 NmL CH_4 g $\text{STV}_{\text{applied}}^{-1}$. In summary, the biodigestion of RSW (without the addition of microalgae) or the co-digestion of this residue with *C. sorokiniana* at the initial concentration of 4×10^6 cells mL^{-1} can be suggested to achieve COD removal above 95% and production of more than 120 NNmL CH_4 g $\text{STV}_{\text{applied}}^{-1}$.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*. Biological treatment. Removal of nutrients. Pig farming. Phycoremediation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.	40
Figura 2 – Usos e aplicações da biomassa de microalgas.	43
Figura 3 – Conceito de biorrefinaria de microalgas: (A) em duas etapas, para produção de biodiesel, bioetanol e biogás; (B) em duas etapas, com recirculação da biomassa residual (digestato) para melhorar a estabilização; e (C) em três etapas, com fermentação acidogênica para aumentar a produção de biomassa.	51
Figura 4 – Processo hipotético de tratamento de águas residuárias de suínos com microalgas.	52
Figura 5 – Fluxograma experimental.	53
Figura 6 – Pontos de coleta de amostras de resíduos suínos e de ambientes aquáticos: (A) biodigestor (entrada e saída); (B) lagoa de águas continentais e (C) espelho d'água formado sobre a lona de um biodigestor.	55
Figura 7 – Ensaio de aclimatação das amostras ambientais: (A) primeiro dia da fase 1 de aclimatação da amostra proveniente da lagoa (quatro repetições); (B) primeiro dia da fase 6 de aclimatação da amostra proveniente da lagoa (quatro repetições); e (C) amostras ambientais em incubadora com controle de iluminação, fotoperíodo e temperatura.	59
Figura 8 – Etapas do isolamento das estirpes: (A) amostras em crescimento, após serem inoculadas pelo método do espalhamento em placas de Petri contendo meio WC solidificado com 1% de ágar; e (B) estirpes inoculadas isoladamente em tubos de ensaio (50 mL) contendo meio WC líquido.	60
Figura 9 – Representação do Delineamento Composto Central Rotacional aplicado para avaliação dos efeitos de temperatura e luminosidade no crescimento das microalgas.	61
Figura 10 – Incubação do ensaio da avaliação da remoção de nutrientes do RSBio e da produção de biomassa e metabólitos.	63
Figura 11 – Reatores dispostos em incubadora durante o ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.	66
Figura 12 – Reatores em batelada dispostos sobre mesa agitadora inserida em câmara de crescimento durante o ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	68
Figura 13 – Abundância relativa da comunidade fitoplanctônica das amostras coletadas: (A) lagoa de águas continentais; e (B) espelho d'água formado na lona do biodigestor.	72
Figura 14 – Fotomicrografias das amostras da lagoa de águas continentais, destacando: (A) <i>Scenedesmus</i> sp.; (B) <i>Desmodesmus</i> sp.; e (C) <i>Chlorella</i> sp.	73
Figura 15 – Fotomicrografias das amostras do espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor, destacando: (A) <i>Scenedesmus</i> sp., (B) <i>Desmodesmus</i> sp., (C) <i>Gonium pectorale</i> ; e (D) <i>Pseudanabaena</i> sp.	73
Figura 16 – Abundância relativa de microrganismos observados nos ensaios de aclimatação realizados com amostras coletadas nos seguintes ambientes: (A) lagoa de águas continentais; e (B) espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor.	76

Figura 17 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo obtidos do DCCR para a variável $\mu_{m\acute{a}x}$	79
Figura 18 – Superfícies de resposta geradas pelo modelo preditivo de $\mu_{m\acute{a}x}$ para a cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada em RSBio em função da temperatura e da luminosidade. ...	80
Figura 19 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo obtidos do DCCR para a variável <i>AC</i>	82
Figura 20 – Superfícies de resposta geradas pelo modelo preditivo de <i>AC</i> para a cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> cultivada em RSBio em função da temperatura e da luminosidade. ...	83
Figura 21 – Regressão entre sólidos suspensos totais e absorvância ($\lambda = 683 \text{ nm}$) para o cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> em RSBio.	84
Figura 22 – Monitoramento do tratamento RSBio0 (sem inóculo de <i>Chlorella sorokiniana</i>) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.	85
Figura 23 – Monitoramento do tratamento RSBio10 (inóculo inicial de <i>Chlorella sorokiniana</i> de 1×10^6 células mL^{-1}) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.	85
Figura 24 – Monitoramento do tratamento RSBio40 (inóculo inicial de <i>Chlorella sorokiniana</i> de 4×10^6 células mL^{-1}) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.	86
Figura 25 – Monitoramento do tratamento RSBio60 (inóculo inicial de <i>Chlorella sorokiniana</i> de 6×10^6 células mL^{-1}) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.	86
Figura 26 – Produção acumulada de metano em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.	98
Figura 27 – Produção acumulada de metano em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos do ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	101
Figura 28 – Monitoramento das variáveis DQO e pH no ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	104
Figura 29 – Produção de metano em relação à remoção de DQO no ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	105
Figura 30 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru0 (sem inóculo de <i>Chlorella sorokiniana</i>) no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	110
Figura 31 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru40 no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	110
Figura 32 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru60 no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção, crescimento e comércio mundial de carnes.	31
Tabela 2 – Produção e consumo de carne suína – ano de 2020.....	32
Tabela 3 – Exportações mundiais de carne suína – ano de 2020.....	33
Tabela 4 – Importações mundiais de carne suína – ano de 2020.....	33
Tabela 5 – Produção de dejetos suínos por categoria animal.	36
Tabela 6 – Composição do meio de cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).	57
Tabela 7 – Descrição das fases de aclimação, com seus respectivos volumes utilizados de RSBio, de meio de cultivo WC e de inóculo de microalgas.	58
Tabela 8 – Fatores e níveis investigados nos experimentos planejados com DCCR.....	60
Tabela 9 – Concentração dos micronutrientes no Meio Mineral Del Nery (MMDN).....	65
Tabela 10 – Descrição dos tratamentos do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.	65
Tabela 11 – Frequência de amostragem do biogás no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.	66
Tabela 12 – Descrição dos tratamentos do ensaio de codigestão de microalgas com Resíduo Suíno Bruto.....	68
Tabela 13 – Frequência de amostragem do biogás no ensaio de codigestão de microalgas com Resíduo Suíno Bruto.	69
Tabela 14 – Caracterização físico-química das amostras coletadas.	71
Tabela 15 – Densidade celular da comunidade fitoplanctônica nos ensaios de aclimação. .	74
Tabela 16 – Respostas das variáveis $\mu_{m\acute{a}x}$ e AC aos fatores temperatura e luminosidade no DCCR.	78
Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a variável $\mu_{m\acute{a}x}$	79
Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a variável AC	82
Tabela 19 – Compilação dos principais parâmetros de crescimento, perfil bioquímico da biomassa, suas produções e produtividades e remoção de nutrientes.....	87
Tabela 20 – Produção estimada de metano* com base na DQO do inóculo de microalgas e do lodo.....	99
Tabela 21 – Estimativas da fração degradável de matéria orgânica, do potencial produtivo de metano e das eficiências de consumo de DQO e de produção de metano no ensaio de biodegradabilidade.....	100
Tabela 22 – Produção estimada de metano* com base na DQO do substrato (microalgas e RSBru) e do lodo.	102

Tabela 23 – Estimativas da fração degradável de matéria orgânica, do potencial produtivo de metano e das eficiências de consumo de DQO e de produção de metano no ensaio de codigestão.....	103
Tabela 24 – Comparação da remoção de DQO entre os ensaios de codigestão e de remoção de nutrientes.....	104
Tabela 25 – Condições experimentais do cultivo de <i>Chlorella sp.</i> , da colheita e do processo de digestão anaeróbia e rendimentos de produção de metano.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
BIOTACE	Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Ciclo Completo
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTD	Carbono Total Dissolvido
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DQO	Demanda Química de Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
FBR	Fotobiorreator
G.L.	Graus de Liberdade
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LATAR	Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (Diodo Emissor de Luz)
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MMDN	Meio Mineral del Nery
NTK	Nitrogênio Total Kjeldahl
pH	Potencial Hidrogeniônico
Q.M.	Quadrado Médio
RAFA	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente
RSBio	Resíduo Suíno Biodigerido
RSBru	Resíduo Suíno Bruto
S.Q.	Soma dos Quadrados
SDA	Secretaria da Defesa Agropecuária
SSI	Sólidos Suspensos Inorgânicos
SSO	Sólidos Suspensos Orgânicos
SST	Sólidos Suspensos Totais
UE	União Europeia
UPL	Unidade Produtora de Leitões
UT	Unidade de Terminação

SUMÁRIO

2 HIPÓTESES.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos Gerais.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
4.1 Suinocultura	31
4.1.1 Cenário Mundial	31
4.1.2 Impactos Ambientais.....	34
4.1.3 Caracterização Físico-Química dos Dejetos	36
4.1.4 Tratamento do Resíduo Suíno.....	36
4.1.4.1 <i>Biodigestão Anaeróbia</i>	39
4.2 Microalgas	42
4.2.1 Usos e Aplicações	43
4.2.2 Composição Celular	44
4.2.3 Sistemas de Cultivo.....	46
4.2.4 Condições de Cultivo	47
4.2.5 Dinâmica de Crescimento.....	48
4.2.6 Fatores que Interferem no Desenvolvimento da Cultura.....	49
4.3 Resíduo Suíno como Substrato para o Cultivo de Microalgas	50
5 MATERIAL E MÉTODOS	53
5.1 Etapa 1 – Coleta e Caracterização dos Resíduos e das Amostras Ambientais.....	54
5.1.1 Caracterização do local de coleta.....	54
5.1.2 Coleta do Resíduo Suíno Bruto e Biodigerido.....	54
5.1.3 Coleta das Amostras de Ambientes Aquáticos	55
5.1.4 Caracterização Físico-Química dos Resíduos e das Amostras Ambientais	55
5.1.5 Contagem e Identificação da Comunidade Fitoplanctônica das Amostras Ambientais..	56
5.2 Etapa 2 – Aclimação e Cultivo de Microalgas em Resíduo Suíno Biodigerido.....	57
5.2.1 Ensaio de Aclimação.....	57
5.2.2 Seleção e Isolamento das Estirpes de Microalgas.....	59
5.2.3 Avaliação dos Efeitos de Fatores Físicos no Crescimento das Microalgas.....	60
5.2.4 Avaliação da remoção de nutrientes e da produção de biomassa e metabólitos.....	62

5.3 Etapa 3 – Ensaios de Biodegradabilidade Anaeróbia e de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto	64
5.3.1 Coleta e Caracterização do Lodo do Biodigestor.....	64
5.3.2 Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia.....	64
5.3.2.1 Avaliação da produção de biogás.....	66
5.3.3 Ensaio de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto.....	67
5.3.3.1 Avaliação da produção de biogás.....	69
5.3.3.2 Análise do perfil de ácidos graxos	69
6.1 Caracterização dos Resíduos Suínos e das Amostras Ambientais.....	71
6.2 Avaliação Quantitativa e Qualitativa da Comunidade Fitoplanctônica das Amostras Ambientais.....	72
6.3 Ensaios de Aclimação.....	74
6.4 Seleção e Isolamento das Estirpes de Microalgas.....	77
6.5 Avaliação dos Efeitos dos Fatores Físicos no Crescimento das Microalgas	77
6.6 Avaliação da Remoção de Nutrientes e da Produção de Biomassa e Metabólitos	84
6.6.1 Modelo de Gompertz.....	88
6.6.2 Manutenção, Produções e Produtividades	88
6.6.2.1 Biomassa.....	88
6.6.2.2 Clorofila a.....	90
6.6.2.3 Lipídeo.....	90
6.6.2.4 Proteína	92
6.6.2.5 Carboidrato.....	92
6.6.2.6 pH.....	93
6.6.3 Remoções no substrato	93
6.6.3.1 Demanda Química de Oxigênio	93
6.6.3.2 Nitrogênio Amoniacal.....	94
6.6.3.3 Ortofosfato	96
6.7 Caracterização do Lodo do Biodigestor	97
6.8 Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia	98
6.9 Ensaio de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto.....	101
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
8 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS.....	119

1 INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os principais produtores e exportadores mundiais de carne suína, sendo a região sul responsável por abrigar aproximadamente a metade do plantel nacional de suínos, o que corresponde a cerca de 20,6 milhões de cabeças (IBGE, 2018). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), em 2019, foram abatidas 46,4 milhões de cabeças de suínos, representando um aumento de 4,6% em relação ao ano anterior.

A adoção do sistema de criação intensiva de suínos no Brasil, iniciada na década de 1980, na região oeste do estado de Santa Catarina, é empregada até os dias atuais e tem sido vista como forte ameaça ambiental, principalmente devido ao aumento do volume de dejetos gerados pelos suínos, grande fonte de poluição dos solos e dos recursos hídricos nas regiões onde se concentram as atividades suinícolas (SILVA; BASSI, 2012). Este cenário se torna mais grave se for levado em consideração a elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) deste grande volume de dejetos, de 10 a 15 vezes superior à do esgoto doméstico, que é cerca de 200 a 500 mg L⁻¹ (OLIVEIRA, 1993).

Os dejetos suínos são ricos em compostos nitrogenados e fosforados e, se descartados em sistemas aquáticos sem uma eficiente remoção destes constituintes, podem causar impactos ambientais de grande magnitude, como eutrofização de rios, lagos e reservatórios, principalmente em ambientes de clima tropical, podendo comprometer a utilização das águas, promover o desequilíbrio dos ecossistemas aquáticos locais, inibir a eficiência da desinfecção da água pelo uso de produtos químicos e causar a transmissão de microrganismos patogênicos (ZHANG *et al.*, 2016; GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017).

A redução do poder poluente do efluente da suinocultura em níveis aceitáveis de lançamento requer investimentos significativos, o que normalmente fica acima da capacidade de pequenos produtores, restando-lhes então a alternativa do lançamento sem tratamento prévio nos cursos naturais de água, com qualidade inferior aos padrões permitidos legalmente.

De acordo com a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 430, de 13 de maio de 2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, ficou estabelecida a concentração máxima de 120 mg L⁻¹ de DBO_{5,20}¹, sendo que este limite somente pode ser ultrapassado se a eficiência mínima de remoção de 60% for atingida ou se houver estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor. Para o nitrogênio

¹ DBO_{5,20} corresponde ao oxigênio consumido na degradação da matéria orgânica, a uma temperatura média de 20 °C durante 5 dias.

amoniaco total, o limite de lançamento previsto nesta resolução é de 20 mg L⁻¹ N e para o fósforo não há padrão definido, ficando a critério dos órgãos estaduais competentes o estabelecimento do limite aceitável para este parâmetro.

A maioria dos processos convencionais de tratamento de dejetos suínos compreendem apenas o tratamento primário para remoção de materiais sólidos e sedimentáveis (por processos físicos) e o tratamento secundário para remoção de matéria orgânica (por processos biológicos e/ou químicos) (SILVA, 2015). Identifica-se, portanto, a necessidade de tratamento terciário para o descarte adequado de efluentes da suinocultura que inclua a remoção de nutrientes.

Neste contexto, várias alternativas têm sido utilizadas e a escolha do processo a ser empregado depende de fatores como vazão afluyente, concentração dos compostos presentes, geração de coprodutos indesejáveis e custos operacionais (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017). Um caminho alternativo, ambientalmente favorável e economicamente viável para a remoção dos nutrientes de resíduos suínos que tem apresentado grande eficiência, é o cultivo de microalgas (WANG *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2016; PRANDINI *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2017; NAM *et al.*, 2017).

As microalgas são organismos microscópicos unicelulares, representadas por uma grande variedade de espécies que vivem em uma larga escala de condições ambientais, capazes de produzir grandes quantidades de metabólitos de interesse ecológico e industrial (DERNER *et al.*, 2006; REVIERS, 2010; SCHMITZ *et al.*, 2012; TOFANA; MIHAIESCU; ODAGIU, 2016), como lipídeos, polissacarídeos, proteínas e hidrocarbonetos, em resposta a variações de fatores físicos, químicos ou biológicos (MICHELON *et al.*, 2015; JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

O cultivo de microalgas acoplado a um sistema de tratamento de dejetos suínos tem como principais objetivos o tratamento biológico do efluente, a partir da remoção de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) e a agregação de valor ao processo, devido à possibilidade de utilização da biomassa produzida em diversas aplicações biotecnológicas (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017; LÓPEZ-PACHECO *et al.*, 2021).

Além de promover o tratamento do efluente, as microalgas podem ser inseridas no interior de um biodigestor a fim de aumentar a capacidade de geração de biogás (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009; PRANDINI *et al.*, 2016; ZHEN *et al.*, 2016) ou ainda se beneficiar de um biogás rico em dióxido de carbono (CO₂), composto indesejado do ponto de vista energético, gerado pela digestão anaeróbia de um efluente, para estimular a produção de

biomassa e, assim, elevar as taxas de remoção de nutrientes do substrato em que estão sendo cultivadas (PRANDINI *et al.*, 2015).

Considerando as limitações ainda existentes em relação ao uso de microalgas (como, por exemplo, o balanço energético desfavorável para produção de biocombustíveis quando em larga escala, as tecnologias de produção de biomassa não alcançarem valores satisfatórios de produtividade para determinadas finalidades e os elevados custos de produção de biomassa devido às tecnologias ainda estarem em desenvolvimento) e atentando para a possibilidade da integração do cultivo de microalgas ao tratamento de águas residuárias, verifica-se a aplicabilidade do conceito de biorrefinaria como forma de superar estas barreiras e viabilizar os processos de forma simultânea (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

Neste contexto, os dejetos de suínos podem ser submetidos primeiramente à biodigestão anaeróbia, aproveitando seu potencial energético com a geração de gases de combustão e, em seguida, o efluente biodigerido pode ser utilizado como substrato para o cultivo de microalgas. Seguindo esta concepção, a biomassa de microalgas pode ser encaminhada para a extração de metabólitos de interesse comercial, e a biomassa residual do processo ser utilizada como insumo na codigestão anaeróbia do resíduo suíno, com intuito de elevar a produção de biogás. Os gases gerados, por sua vez, podem ser separados e recirculados no sistema, seja como fonte de carbono inorgânico (CO₂) para as microalgas, seja como fonte de calor e/ou eletricidade na cogeração de energia, através da combustão do metano (CH₄).

Em face ao crescente número de abate de suínos no país (IBGE, 2020), observa-se grande possibilidade de aplicação desta alternativa biotecnológica no tratamento de efluentes da suinocultura no Brasil. Entretanto, ainda pouco se conhece sobre como este tipo de resíduo pode interferir na produção de metabólitos intracelulares de microalgas, quando utilizado como substrato para seu cultivo. Sendo assim, também não são bem conhecidos os efeitos subsequentes na produtividade de biogás quando esta biomassa de microalgas passa a ser utilizada como insumo na codigestão de resíduo suíno.

Portanto, buscando contribuir para o suprimento da demanda por tais conhecimentos, foi proposta esta pesquisa, cujos objetivos centrais são: otimizar o cultivo de microalgas em resíduo suíno biodigerido visando à remoção de nutrientes deste efluente e à aplicação da biomassa gerada como substrato na codigestão anaeróbia de resíduo suíno bruto, no intuito de avaliar sua implicação na produtividade de metano.

2 HIPÓTESES

Esta pesquisa baseou-se nas premissas de que o cultivo de microalgas em efluente suíno biodigerido permite que este resíduo seja tratado biologicamente a partir da assimilação de nutrientes por estes microrganismos e que a biomassa gerada sirva tanto como substrato na codigestão anaeróbia de resíduos, elevando a produtividade de gás metano, como também como fonte de metabólitos passíveis de serem utilizados em diversas aplicações biotecnológicas.

Portanto, pressupõe-se que esta seja uma alternativa de agregar valor ao cultivo de microalgas e ao tratamento do efluente simultaneamente, devido à possibilidade de configuração de um sistema fechado em que haja, além da geração, a recirculação de coprodutos, fomentando o conceito da economia circular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Esta pesquisa teve como objetivos principais selecionar estirpes de microalgas de ambientes naturais e artificiais e otimizar seu cultivo em resíduo suíno biodigerido visando à remoção de nutrientes deste efluente, além de aplicar a biomassa gerada como substrato na codigestão anaeróbia do resíduo suíno bruto, a fim de verificar seu impacto na produtividade de metano.

3.2 Objetivos Específicos

Para o alcance dos objetivos gerais, fez-se necessário o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

- (i) aclimatar as amostras ambientais visando selecionar estirpes de microalgas tolerantes ao resíduo suíno biodigerido;
- (ii) otimizar o cultivo das microalgas selecionadas, em função de diferentes condições de temperatura e luminosidade, utilizando como substrato o resíduo suíno biodigerido;
- (iii) analisar o efeito da densidade celular de microalgas na remoção de nutrientes do resíduo suíno biodigerido e no perfil bioquímico da biomassa produzida; e
- (iv) investigar o potencial metanogênico da codigestão anaeróbia de microalgas com o resíduo suíno bruto.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Suinocultura

4.1.1 Cenário Mundial

No *ranking* das carnes mais produzidas e consumidas mundialmente, a carne suína ocupa terceiro lugar (Tabela 1). Entretanto, no último quinquênio, a produção mundial de carne suína decresceu, em média, 2,7% a.a., ao contrário das demais carnes, com variação positiva na produção: carne de frango (3,3% a.a.), pescados (1,6% a.a.) e carne bovina (1,2% a.a.). Vale ressaltar que a carne suína não é consumida por parte significativa da população por motivos religiosos (principalmente por muçulmanos, hindus, judeus e adventistas) (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Produção, crescimento e comércio mundial de carnes.

Carnes	Produção (mil toneladas)	Variação anual 2015-2020 (%)	Exportação (mil toneladas)	Participação exp./produção (%)
Pescados	178.500	1,6	67.000	37,5
Carne de frango	103.498	3,3	12.497	12,1
Carne suína	95.223	-2,7	10.383	10,9
Carne bovina	61.861	1,2	11.507	18,6

Nota: os dados de produção e exportação de pescados foram obtidos de *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2020). Os demais (carne suína, frango e bovina) são estimativas para outubro de 2020, obtidos de *United States Department of Agriculture* (2020). Os valores da produção de pescados não incluem plantas aquáticas.

Fonte: *United States Department of Agriculture* (2020) e *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2020).

Verifica-se que a quantidade de carne suína transacionada internacionalmente é inferior à das demais carnes, fato que se deve ao protecionismo dos importadores em relação à segurança alimentar e também devido às restrições de natureza religiosa, como já mencionado.

A baixa transação internacional de carne suína favorece seu comércio interno, tanto é que os cinco maiores produtores mundiais de carne suína são também os maiores consumidores. Em 2020, estes cinco países² foram responsáveis por cerca de 84% da

² Para efeito estatístico, a União Europeia foi considerada um só país (composta por 28 países).

produção e de 81% do consumo mundial dessa carne (Tabela 2) (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2021).

Tabela 2 – Produção e consumo de carne suína – ano de 2020.

Países	Produção (mil toneladas)	Participação (%)	Variação anual 2017-2020 (%)	Consumo (mil toneladas)	Participação (%)	Variação anual 2017-2020 (%)
China	36.340	37,6	-11,1	41.521	43,2	-8,5
UE	24.150	25,0	0,7	19.621	20,4	-2,1
EUA	12.843	13,3	3,5	10.031	10,4	1,7
Brasil	4.125	4,3	3,6	2.949	3,1	0,0
Rússia	3.611	3,7	7,3	3.468	3,6	1,7
Outros	15.629	16,2	0,1	18.579	19,3	-0,6
Total	96.698	100,0	-4,6	96.169	100,0	-4,6

Fonte: *United States Department of Agriculture* (2021).

Em relação ao consumo *per capita* de carne suína, China/Hong Kong/Macau e União Europeia (UE) são os maiores consumidores, ambos com consumo médio de pouco mais de 40 kg hab⁻¹ ano⁻¹. Nos Estados Unidos da América (EUA), o consumo é de 29,6 kg hab⁻¹ ano⁻¹, superior ao da Rússia, de 22,4 kg hab⁻¹ ano⁻¹, e equivalente a quase o dobro do brasileiro, de 15,9 kg hab⁻¹ ano⁻¹ (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020; NATIONAL PORK BOARD, 2018).

As exportações mundiais de carne suína são concentradas em três principais origens: UE, EUA e Canadá, que juntas representam mais de 80% do total (Tabela 3). Apesar do Brasil ser o quarto maior exportador mundial, seu volume exportado representa apenas 10,2% do total transacionado internacionalmente entre todos os países. Esta pequena participação em volume se justifica pela produção brasileira de carne suína ser majoritariamente destinada ao consumo doméstico: em 2019, 81% da produção foi absorvida pelo mercado interno (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020).

Dentre os principais importadores, destaca-se a China, que ocupa o primeiro lugar, com aproximadamente 5,3 milhões de toneladas, responsável por 48,3% das importações e com a maior variação anual de importação (83,9% a.a.) (Tabela 4).

Tabela 3 – Exportações mundiais de carne suína – ano de 2020.

Países	Exportação (mil toneladas)	Total exp./produzido (%)	Participação exp./total mundial (%)	Varição anual 2017-2020 (%)
UE	4.546	18,8	39,2	21,5
EUA	3.303	25,7	28,5	9,8
Canadá	1.543	72,4	13,3	6,5
Brasil	1.178	28,6	10,2	17,3
China	100	0,3	0,9	-17,2
Outros	933	6,0	8,0	28,3
Total	11.603	12,0	100	14,4

Fonte: *United States Department of Agriculture* (2021).

Tabela 4 – Importações mundiais de carne suína – ano de 2020.

Importadores	Importações (mil toneladas)	Participação imp./total mundial (%)	Varição anual 2017-2020 (%)
China	5.281	48,3	83,9
Japão	1.412	12,9	-1,4
México	945	8,6	2,3
Coreia do Sul	554	5,1	-4,7
EUA	410	3,7	-6,3
Outros	2.335	21,3	-2,5
Total	10.937	100,0	15,0

Fonte: *United States Department of Agriculture* (2021).

A suinocultura é uma atividade presente em todas as regiões do Brasil. Em 2018, o efetivo nacional de suínos foi de 41,4 milhões de cabeças, mostrando aumento de 0,7% em relação ao ano anterior. As regiões sul, sudeste, centro-oeste, nordeste e norte abrigam, respectivamente, 49,7%; 16,9%; 15,8%; 13,9% e 3,8% do plantel instalado no país (IBGE, 2018).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (2020), a produção de carne suína no Brasil foi de 3,98 milhões de toneladas, em 2019. A região sul destaca-se nacionalmente: neste mesmo ano, foi responsável por 68,7% dos abates do país e por 94,2% das exportações de origem brasileira.

No Brasil, o consumo de carne suína é, contrariamente à média do resto do mundo, inferior ao das carnes bovinas e de frango. Entretanto, entre 2017 e 2019, o país mostrou aumento de 5,6% no consumo de carne suína, superior ao das demais carnes: o consumo de carne de frango cresceu apenas 1,1% e o de carne bovina reduziu 1,6% neste mesmo período (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2021).

Este intenso crescimento do consumo de carne suína no Brasil posicionou-o como o quinto maior consumidor mundial em 2020, avanço que se justifica pelos aumentos expressivos da população brasileira nas últimas duas décadas (23,5%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2020).

Nos últimos três anos, o Brasil tem exportado, em média, aproximadamente 17% de sua produção para os cinco continentes, o que inclui mais de oitenta países, sendo que, em 2019, China e Hong Kong foram os principais importadores de carne suína brasileira (33,6% e 22,0% do total das exportações brasileiras, respectivamente) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2020).

4.1.2 Impactos Ambientais

A adoção do sistema de criação intensiva de suínos, ao mesmo tempo que permitiu ganhos de escala e produtividade, levou ao recrudescimento dos impactos ambientais dessa atividade (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

Os sistemas confinados, resultantes da modernização dos sistemas de produção suinícola iniciada na década de 70, contribuíram para a adoção do manejo de dejetos na forma líquida, o que agravou os problemas de captação, armazenagem, tratamento, transporte e distribuição dos dejetos. Sendo assim, o potencial poluidor da suinocultura se intensificou e o manejo adequado dos resíduos tornou-se uma necessidade (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

A suinocultura é uma atividade que demanda elevado consumo de água, principal insumo na criação de suínos. Tal consumo varia conforme os ciclos de produção adotados pelo produtor. Nestes ciclos, estão envolvidos interferentes como qualidade de alimentação, estado fisiológico da criação (idade, fase reprodutiva, peso, etc.) e fatores ambientais (temperatura, umidade, tipo de abrigo). De acordo com a Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina ³ (FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE, 2014), o consumo diário de água por animal é estimado em 72,9 litros no ciclo completo (CC); 35,3 litros na unidade produtora de leitões (UPL) e 8,3 litros na unidade de terminação (UT) ⁴.

Além do elevado consumo de água, o volume de dejetos produzido pelos suínos é outro aspecto de grande relevância, pois devido à expansão do setor, configura-se como uma

³ Atualmente representado como IMA – Instituto de Meio Ambiente de Santa Catarina.

⁴ O CC compreende todas as etapas da produção, desde a gestação até a terminação. A UPL objetiva a produção de leitões até a saída da creche. A UT executa a engorda dos leitões recebidos de uma UPL ou de um crechário, entregando suínos para abate (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS, 2016).

crescente fonte de poluição nas regiões onde se concentram as atividades suinícolas (SILVA; BASSI, 2012).

A emissão de gases voláteis pela urina e pelas fezes dos suínos produzem efeitos ambientais negativos, causando danos à saúde de pessoas e animais. O carbamato de amônio ($\text{H}_2\text{NCOONH}_4$) é um composto presente nos dejetos suínos, de odor desagradável e capaz de se dissociar nos gases amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2) (LOPES; ANTONIOSI FILHO; ALVES, 2013). A amônia é um gás prejudicial à saúde humana, podendo causar complicações como irritação ocular, nasal e cutânea ou gerar distúrbios neurológicos. Além disso, a amônia contribui para a ocorrência de chuva ácida, que tem implicações tóxicas sobre os recursos naturais (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2017).

Outro gás gerado pela atividade suinícola é o metano (CH_4), subproduto da decomposição anaeróbia de material orgânico e que contribui 24 vezes mais para o efeito estufa quando comparado ao dióxido de carbono (SILVA *et al.*, 2005). Também são oriundos da suinocultura os gases óxido nitroso (N_2O), agente promotor do aquecimento global (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016), e o sulfeto de hidrogênio (H_2S), caracterizado por seu mau odor capaz de causar desconforto aos seres humanos e aos animais (FERNANDES, 2012).

Em sistemas de confinamento de suínos, mesmo que não haja manifestação dos sintomas de infecção nas criações, organismos patogênicos podem estar presentes na urina e fezes destes animais. Desta forma, o lançamento de efluente suíno sem prévia desinfecção, pode disseminar grandes quantidades de patógenos nos cursos d'água, gerando riscos à saúde da população e dos animais que utilizam direta ou indiretamente deste recurso hídrico (OLIVEIRA, 1993).

Além disso, o descarte de dejetos sem prévio tratamento pode causar eutrofização nos ambientes aquáticos, comprometendo, deste modo, a utilização das águas, pois promove o desequilíbrio dos ecossistemas locais, reduz a eficiência da desinfecção da água destinada ao abastecimento público e favorece transmissão de microrganismos patogênicos (NOVAES JUNIOR *et al.*, 2013; RODRIGUES; FILHO, 2004).

Os dejetos líquidos, quando armazenados em lagoas desprovidas de revestimento impermeável ou quando aplicados como biofertilizantes agrícolas sem o devido controle, podem ocasionar sobrecarga da capacidade de filtração e retenção de nutrientes no solo. Conseqüentemente, os nutrientes em excesso podem atingir águas subterrâneas ou superficiais, desencadeando problemas de contaminação (OLIVEIRA, 1993).

4.1.3 Caracterização Físico-Química dos Dejetos

Os dejetos suínos constituem-se de fezes, urina, resíduos de ração e água. Seu volume varia de acordo com as diferentes fases do sistema de produção, como mostrado na Tabela 5. A maior produção de dejetos ocorre na fase de lactação, quando diariamente são gerados 18 kg de esterco e urina e produzidos 27 litros de dejetos líquidos por animal (ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

Tabela 5 – Produção de dejetos suínos por categoria animal.

Categoria animal	Esterco + urina (kg dia⁻¹)	Dejetos líquidos (L dia⁻¹)
Suínos	4,90	7,0
Porca - gestação	11,0	16,0
Porca - lactação + leitões	18,00	27,0
Cachaço (porco reprodutor)	6,00	9,0
Leitões na creche	0,95	1,4

Fonte: Konzen (1980).

Os principais componentes dos dejetos suínos são o nitrogênio (N), o fósforo (P) e alguns metais potencialmente tóxicos, como zinco (Zn) e cobre (Cu), além de microrganismos fecais patogênicos (FERNANDES, 2012). A composição destes constituintes varia enormemente em função da quantidade de água em que o dejetos se encontra diluído, do tipo de alimentação e da fase de desenvolvimento do animal (OLIVEIRA, 1993).

4.1.4 Tratamento do Resíduo Suíno

Os processos convencionais de tratamento de dejetos suínos, de modo geral, compreendem apenas o tratamento primário com o objetivo de remover materiais sólidos por processos físicos e o tratamento secundário no intuito de remover a matéria orgânica por processos biológicos e/ou químicos (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017).

As técnicas de tratamento físico podem ser empregadas para promover a separação das fases sólida e líquida do efluente suíno, bem como para reduzir o teor de umidade presente no dejetos. Como técnicas de separação das partículas em suspensão, destacam-se: decantação, centrifugação, peneiramento e/ou prensagem. Para a redução de umidade presente nos dejetos, também podem ser aplicadas as técnicas de evaporação, secagem ou adição de

materiais absorventes (como resíduos com elevado teor de matéria seca) (DIESEL; MIRANDA; PERDOMO, 2002).

Devido à diferente solubilidade dos elementos presentes no efluente, a separação das fases proporciona uma divisão heterogênea destes: a maior parte dos fosfatos e do nitrogênio orgânico permanecessem majoritariamente na fração sedimentada, ao passo que o nitrogênio amoniacal e o potássio permanecem dissolvidos na fase líquida, por serem mais solúveis (BELLI FILHO; CASTILHOS JUNIOR, 1990).

Os sistemas de tratamento biológico de resíduo suíno podem ser categorizados em aeróbios ou anaeróbios, de acordo com a presença ou a ausência de oxigênio nos processos de transformação da matéria orgânica. Dentre as técnicas de tratamento biológico aeróbio, destacam-se a compostagem, as lagoas de estabilização e os diques de oxidação. Quanto aos processos anaeróbios, tem-se as lagoas e os biodigestores anaeróbios (OLIVEIRA, 1993).

A compostagem configura-se no processo de decomposição aeróbia da matéria orgânica por microrganismos com produção de dióxido de carbono, calor e um resíduo estabilizado denominado composto. Neste processo, os dejetos suínos são misturados a outros compostos orgânicos, como maravalha, serragem ou palha e, sob condições controladas (pH, temperatura, umidade, aeração e concentração de nutrientes), se transformam em um produto de alta qualidade que pode ser utilizado como fertilizante agrícola. Na compostagem, em virtude do processo aeróbio, os patógenos e os odores são significativamente reduzidos, assim como as emissões de gases de efeito estufa (OLIVEIRA, 1993; ITO; GUIMARÃES; AMARAL, 2016).

As lagoas de estabilização podem ser classificadas, sob o ponto de vista de tratamento, em: facultativas, aeróbias (com aeração natural), aeradas (com aeração mecânica) e anaeróbias. (SILVA, 1977).

As lagoas facultativas possuem uma região superficial aeróbia, uma zona facultativa na porção central e uma região de anaerobiose no leito onde se encontra o lodo sedimentado. Neste tipo de lagoa, estabelece-se uma relação simbiótica entre algas e bactérias: as algas presentes na camada superficial liberam oxigênio através da fotossíntese, que é consumido pelas bactérias no processo de respiração; as bactérias, por sua vez, alimentam-se da matéria orgânica dos dejetos e liberam como subproduto o dióxido de carbono necessário à fotossíntese das algas (VON SPERLING, 2017).

As lagoas de aeração natural são rasas, portanto, requerem grandes extensões de áreas e, por isso, são consideradas inexecutáveis economicamente. As aeradas mecanicamente funcionam de maneira análoga ao processo de lodos ativados, porém sem retorno do lodo: a

alta turbulência criada pela agitação mecânica mantém grande parte dos sólidos em suspensão e os sólidos que se sedimentam no fundo da lagoa são decompostos de forma anaeróbia. (OLIVEIRA, 1993).

Nas lagoas anaeróbias, os processos ocorrem na ausência de oxigênio livre no meio líquido. Desta forma, os organismos utilizam-se do oxigênio que pode estar disponível de forma combinada nas moléculas da matéria orgânica. O propósito deste tipo de lagoa é a destruição e a estabilização do material orgânico e não a desinfecção do efluente para posterior descarte em corpos hídricos. Portanto, as lagoas anaeróbias podem ser empregadas como uma etapa preliminar ao tratamento aeróbio, no intuito de reduzir a carga orgânica, possibilitando a redução do tamanho das unidades subsequentes (VON SPERLING, 2017).

Os diques de oxidação configuram-se em sistemas equipados com câmaras de aeração artificial em circuito fechado ou contínuo. Capazes de proporcionar uma redução de 80 a 90% de DBO, são de baixo custo, fácil operação e exigem pouca manutenção. Por se tratar de um processo aeróbio, não resulta em odores comuns ao processo anaeróbio, entretanto emissões de amônia podem ocorrer em condições alcalinas ($\text{pH} > 10$), quando o suprimento de oxigênio é inadequado ou quando o processo de nitrificação deixa de ocorrer (LOEHR, 1974).

Os biodigestores anaeróbios são sistemas nos quais ocorre um processo biológico natural de decomposição da matéria orgânica na ausência de oxigênio molecular. No interior destes biodigestores, a interação entre os diferentes microrganismos presentes no efluente promove a transformação dos compostos orgânicos complexos em produtos mais simples, resultando na formação de biogás e de um resíduo líquido rico em minerais que pode ser aplicado em culturas agrícolas como biofertilizante (TOERIEN; HATTINGH, 1969; MOSEY, 1983; NOVAES, 1986; FORESTI et al., 1999).

O biogás produzido pela biodigestão é composto principalmente de dióxido de carbono e metano, ambos de grande utilização em diversos segmentos da indústria. A combustão do metano libera energia térmica que, por sua vez, pode ser convertida em outras formas de energia. O conteúdo energético do biogás pode ser aproveitado na própria propriedade e o excedente pode ser negociado com as concessionárias locais por meio do sistema de compensação de energia. Portanto, a biodigestão anaeróbia configura-se não apenas como um sistema de tratamento de efluentes, mas também como uma alternativa viável de redução de custos energéticos da atividade na qual esteja enquadrada (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS, 2016).

Vale ressaltar que, para produção ou comercialização do resíduo suíno biodigerido como biofertilizante no Brasil, a Lei Federal nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980⁵ estabelece a obrigatoriedade de registro do produto no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), bem como determina a exigência de assistência técnica permanente por profissional habilitado, a quem deve ser conferida responsabilidade funcional.

Além disso, os fertilizantes produzidos, importados ou comercializados devem atender aos limites estabelecidos nos Anexos I, II, III, IV e V da Instrução Normativa nº 27, de 5 de junho de 2006, da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA), no que se refere às concentrações máximas admitidas para agentes fitotóxicos, patogênicos ao homem, animais e plantas, metais pesados tóxicos, pragas e ervas daninhas. Em relação às especificações, garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos fertilizantes, devem ser observadas as normas estabelecidas pela Instrução Normativa nº 61, de 08 de julho de 2020, da SDA/MAPA.

4.1.4.1 *Biodigestão Anaeróbia*

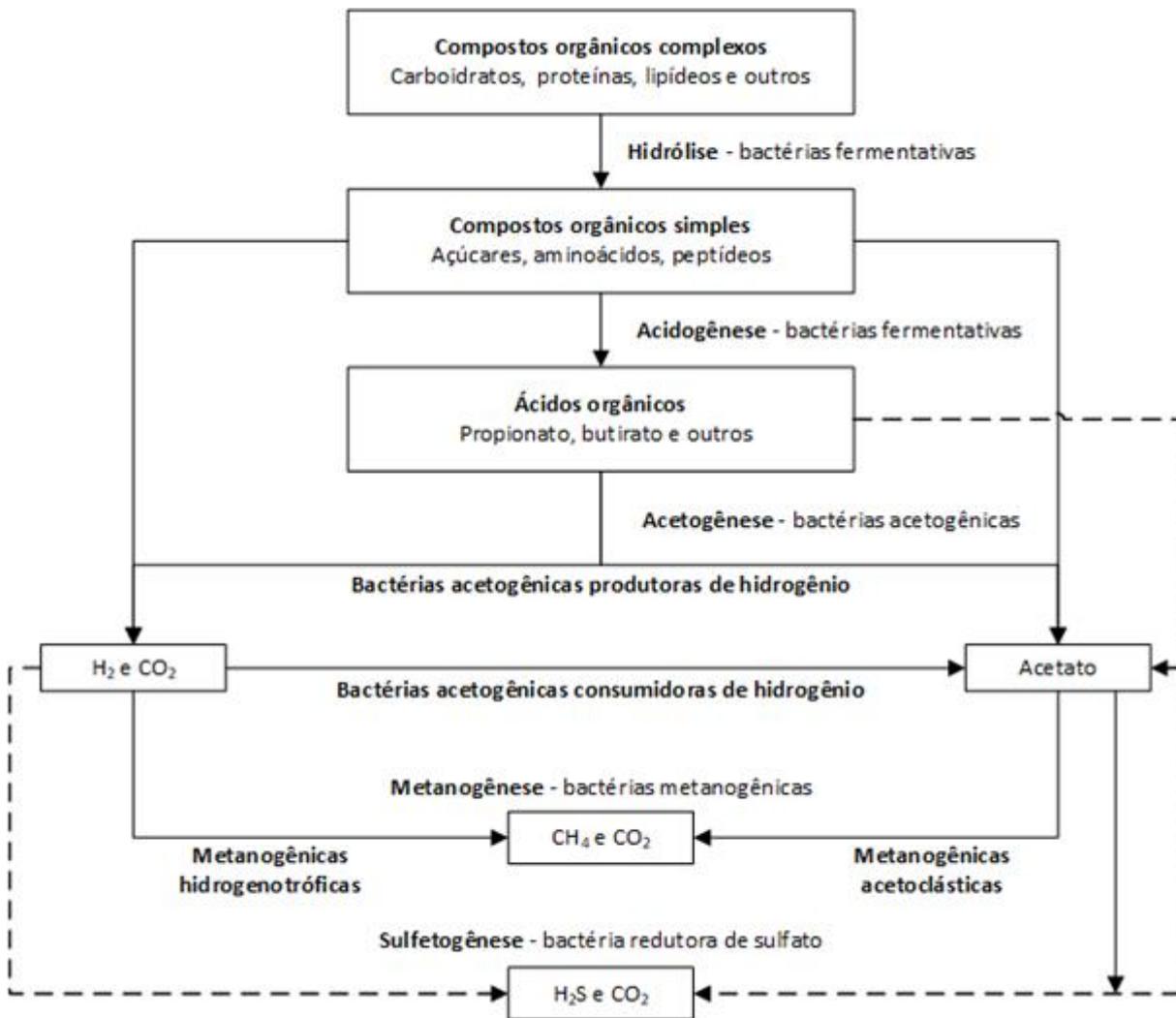
Em relação ao tratamento do efluente por meio biodigestão anaeróbia, alguns benefícios podem ser destacados, como elevada redução de DBO, pequena produção de lodo e baixos custos operacionais e de investimento (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Segundo Chernicharo (2007), o processo de biodigestão anaeróbia pode ser dividido em cinco fases: hidrólise, acidogênese, acetogênese, metanogênese e sulfetogênese (Figura 1). Todas as etapas ocorrem de forma simultânea, portanto, uma alteração significativa em qualquer uma delas pode afetar todo o processo de biodigestão.

Na conversão de substrato em biogás, atuam três grupos principais de microrganismos: bactérias fermentativas (hidrolíticas e acidogênicas), bactérias sintróficas (acetogênicas) e arqueias metanogênicas. Há, ainda, um grupo de bactérias e arqueias sulforedutoras, que podem atuar na rota sulfetogênica, dependendo do conteúdo de compostos sulfurosos oxidados presentes na água residuária.

⁵ Regulamentada em forma de anexo pelo Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004.

Figura 1 – Rotas metabólicas e grupos microbianos envolvidos na digestão anaeróbia.



Fonte: Adaptado de Chernicharo (2007).

Cada grupo microbiano tem comportamentos fisiológicos exclusivos e funções específicas no processo de degradação, conforme detalhado a seguir:

- (i) **Hidrólise:** nesta fase, as bactérias hidrolíticas liberam enzimas extracelulares que degradam (hidrolisam) os compostos orgânicos complexos dos substratos solúveis em pequenas moléculas simples que são transportadas para o interior das células dos microrganismos para serem metabolizadas (OLIVEIRA et al., 2004). Nessa fase, proteínas são transformadas em aminoácidos, carboidratos em açúcares solúveis e lipídeos em ácidos graxos de cadeia longa e/ou glicerina (SOUZA, 2005).
- (ii) **Acidogênese:** nesta etapa, os produtos gerados na primeira fase são metabolizados pelas mesmas bactérias fermentativas, sendo transformados em

ácidos orgânicos (etanoico, propiônico, butírico, isobutírico, fórmico), assim como em gás hidrogênio e dióxido de carbono (OLIVEIRA *et al.*, 2004). A formação de produtos nesta fase também depende da quantidade de hidrogênio dissolvido na mistura. Quando a concentração de hidrogênio é muito alta, a geração de ácidos orgânicos de cadeia longa é favorecida, em detrimento da geração de acetato e hidrogênio.

- (iii) Acetogênese: esta fase depende da atividade de dois grupos de bactérias acetogênicas, que são as produtoras de hidrogênio (que convertem os compostos orgânicos anteriormente gerados em acetato, liberando hidrogênio e dióxido de carbono) e as consumidoras de hidrogênio (que produzem acetato a partir de hidrogênio e dióxido de carbono). Esta é uma etapa muito delicada da biodigestão anaeróbia, na qual a produção de hidrogênio precisa ser controlada, tendo em vista que uma elevada concentração de hidrogênio desfavorece a conversão de ácidos orgânicos em acetato. Conseqüentemente, o acúmulo de ácidos orgânicos de cadeias longas na acetogênese causa a acidificação do meio e inibe a ação das bactérias metanogênicas, comprometendo a geração de biogás. A redução de hidrogênio desta fase é realizada justamente por bactérias da metanogênese, que processam hidrogênio, dióxido de carbono e acetato para formação de metano e gás carbônico. Sendo assim, a sobrevivência das bactérias acetogênicas somente se garante em função do bom desempenho metabólico das bactérias metanogênicas e vice-versa (BRASIL, 2015).
- (iv) Metanogênese: através da ação de microrganismos metanogênicos pertencentes ao domínio das Archeas, o acetato, o hidrogênio e o dióxido de carbono são finalmente convertidos em metano e dióxido de carbono. Archeas que utilizam o hidrogênio e o dióxido de carbono são classificadas como metanogênicas hidrogenotróficas, enquanto as que utilizam acetato são denominadas metanogênicas acetoclásticas (BRASIL, 2015). Segundo Nogueira (1992), cerca de 70% do metano formado provém do acetato (etanoato) e o restante é proveniente do dióxido de carbono e hidrogênio.
- (v) Sulfetogênese: no processo de digestão anaeróbia, as bactérias sulforedutoras competem com os demais grupos pela utilização dos ácidos voláteis e outros compostos intermediários, gerando dióxido de carbono e sulfeto de hidrogênio (H₂S), que pode promover a precipitação de íons metálicos. Em substratos onde há uma certa concentração de compostos sulfurados (sulfato, sulfito ou

outros), a ação dos microrganismos sulforedutores altera as rotas metabólicas da biodigestão anaeróbia, pois elas são capazes de utilizar uma ampla variedade de substratos, competindo com as bactérias fermentativas, acetogênicas e metanogênicas (RIZZONI *et al.*, 2012).

O sucesso da biodigestão varia em função da afinidade entre os processos envolvidos, portanto, é dependente de fatores como carga diária de sólidos voláteis, alcalinidade, pH, temperatura, qualidade do material orgânico e presença de antibióticos, inseticidas e desinfetantes (KUNZ; OLIVEIRA; PERDOMO, 2008).

4.2 Microalgas

As microalgas representam um grupo polifilético de organismos de grande diversidade morfofisiológica e genética que vivem em uma larga escala de condições ambientais. Elas são capazes de produzir metabólitos de interesse ecológico e industrial (DERNER *et al.*, 2006; REVIERS, 2010; SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012), como lipídeos, polissacarídeos, proteínas e hidrocarbonetos (LOURENÇO, 2006), em resposta a variações dos fatores físicos (tamanho e forma dos taques de cultivo, luminosidade e temperatura), químicos (disponibilidade de nutrientes, concentração de CO₂, salinidade e pH) ou biológicos (taxas metabólicas da espécie cultivada, tamanho e densidade das células e influência de outros organismos) (MICHELON *et al.*, 2015).

A caracterização sistemática das microalgas envolve a avaliação de diversos critérios como tipo de pigmentos presentes, natureza química dos produtos de reserva, constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004), além de configurações citológicas e morfológicas como a existência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de desenvolvimento do núcleo e de divisão das células, a presença e a caracterização de envoltório dos cloroplastos e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear (DERNER *et al.*, 2006).

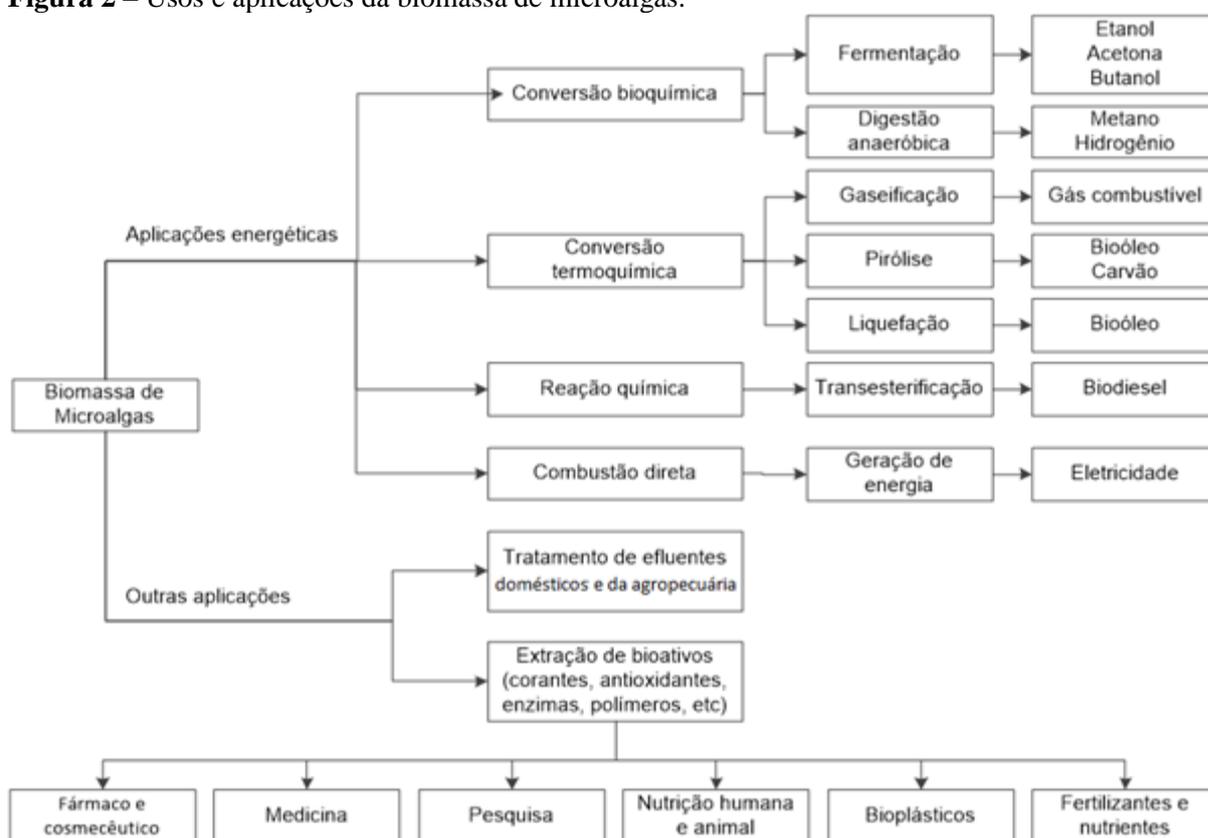
De acordo com Ohse *et al.* (2007), os agrupamentos mais abundantes em número de espécies são: diatomáceas (Bacillariophyceae), clorofíceas (Chlorophyceae), cianobactérias (Cyanobacteria) e algas douradas (Chrysophyceae), sendo o terceiro grupo citado de estrutura celular procariótica e os demais, de estrutura eucariótica (REVIERS, 2010; BICUDO; MENEZES, 2006).

4.2.1 Usos e Aplicações

As aplicações de microalgas são definidas pela composição química das células, ou seja, dependem da presença e da abundância de constituintes celulares como proteínas, carboidratos, lipídeos, pigmentos, entre outros (LOURENÇO, 2006).

Conforme elucidado na Figura 2, a biomassa de microalgas pode ser utilizada na produção de energia, nas indústrias (de fármacos, de cosméticos e de bioplásticos), no tratamento de efluentes, na alimentação humana e animal, na aquicultura e agricultura, além de ser objeto de interesse nas áreas de pesquisa e medicina (BECKER, 2004; SCHMITZ et al., 2012).

Figura 2 – Usos e aplicações da biomassa de microalgas.



Fonte: adaptado de Tsukahara e Sawayama (2005).

No setor energético, as microalgas são vistas como matéria-prima alternativa e renovável que podem ser utilizadas para geração de eletricidade, por meio de combustão direta ou pela conversão química, termoquímica ou bioquímica a diferentes tipos de biocombustíveis como etanol, acetona, butanol, metano, hidrogênio, bio-óleo, carvão ou biodiesel (TSUKAHARA; SAWAYAMA, 2005).

As microalgas podem ser aplicadas na indústria farmacêutica e na fabricação de cosméticos, devido sua capacidade de produzir compostos com propriedades terapêuticas, tais como pigmentos carotenoides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina, etc.) e ácidos graxos polinsaturados (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Devido sua elevada capacidade em fixar dióxido de carbono e biofixar metais tóxicos, as microalgas possuem grande importância ecológica. Estas características possibilitam o emprego de algumas espécies no tratamento de águas residuais domésticas ou de efluentes das atividades agroindustriais (SCHMITZ *et al.*, 2012; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

O consumo de microalgas como alimento ou suplemento nutricional por seres humanos é um hábito realizado há séculos em determinadas regiões do mundo. Atualmente, as microalgas podem ser adquiridas na forma de pó, tabletes, cápsulas ou extratos ou incorporadas em massas, petiscos, doces, bebidas, etc. (DERNER *et al.*, 2006).

Na aquicultura, as microalgas podem ser fornecidas como alimento para algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e diversos organismos forrageiros de interesse econômico (DERNER *et al.*, 2006). Na agricultura, podem ser utilizadas como fertilizantes, atuando como condicionador de solo (BARBOSA, 2003).

A viabilidade financeira das diversas aplicações a partir das microalgas dependem de medidas que contribuam tanto para o melhor aproveitamento dos produtos metabolizados e dos coprodutos formados quanto para a diminuição do uso de energia durante o processamento da biomassa. A integração dos processos fabris destinados à obtenção simultânea de diferentes produtos, o que define o conceito de biorrefinaria, é uma estratégia que pode ser aplicada neste sentido (ROSSI, 2013; SANTOS, 2013).

4.2.2 Composição Celular

A concentração de cada componente bioquímico das microalgas é dependente da natureza dos organismos, das condições de cultivo e do próprio estado fisiológico da cultura, o que possibilita diferentes composições químicas para uma mesma espécie em função da manipulação de alguns fatores (OHSE *et al.*, 2007).

Segundo Hu *et al.* (2008), muitas espécies de microalgas podem acumular quantidades significativas de lipídeos. Os lipídeos compreendem um amplo grupo de substâncias químicas naturais de alta solubilidade em solventes orgânicos apolares e de baixa solubilidade em água (NELSON; COX, 2011). A natureza física dos lipídeos e sua

consequente nomenclatura são determinados de acordo com o comprimento da cadeia, grau de insaturação e distribuição dos radicais.

O óleo presente nas células das microalgas é composto principalmente pela mistura de ácidos graxos insaturados e, em menor proporção, de ácidos graxos saturados (KHAN *et al.*, 2009). Segundo Radmann e Costa (2008), em algumas espécies, os ácidos graxos polinsaturados podem representar entre 25 e 60% dos lipídeos totais. Esta elevada concentração de ácidos graxos polinsaturados presentes em algumas espécies pode limitar seu uso como matéria-prima para produção de biodiesel, por exemplo, uma vez que insaturação facilita a oxidação deste produto durante seu armazenamento (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Por serem microrganismos fotossintetizantes, as microalgas também podem produzir diferentes proporções de pigmentos em resposta às condições de iluminação empregadas no cultivo. As microalgas são capazes de absorver luz em diferentes faixas espectrais, específicas para cada tipo de pigmento. Esta especificidade de absorção possibilita que as concentrações de cada pigmento sejam determinadas por meio do uso de diferentes comprimentos de onda nas leituras espectrofotométricas. Pelo cultivo de microalgas, é possível obter pigmentos com cores que variam de verde-amarelo a azul-esverdeado, além de seus derivados que, em condições químicas extremas, podem produzir cores que vão do laranja ao vermelho (MARQUEZ; BORRMANN, 2009; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

Três classes de pigmentos podem ser encontradas na biomassa de microalgas: ficobilinas, clorofilas e carotenoides. As ficobilinas pertencem ao grupo das proteínas e os demais pigmentos, ao grupo dos lipídeos (BARSANTI; GUALTIERI, 2006; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

As clorofilas, praticamente os únicos pigmentos naturais verdes, são essenciais para o processo de fotossíntese. Podem ser aplicadas na fabricação de corantes lipossolúveis em alimentos, fármacos, cosméticos e produtos de higiene pessoal. A proporção entre os diversos tipos de clorofila varia em função da intensidade luminosa e da fonte de nitrogênio fornecida (DANESI *et al.*, 2011).

Estruturalmente, as clorofilas são moléculas hidrofóbicas complexas de alto grau de insaturação. A partir da estrutura básica, existem cinco classes de clorofilas que podem ser encontradas naturalmente em algas: clorofilas *a*, *b*, *c*, *d* e *e*.

A clorofila *a* é a mais abundante, está presente em todas as espécies de microalgas, independente da divisão taxonômica, e tem função catalítica na primeira etapa do processo de fotossíntese (fotoquímica). As demais clorofilas estão distribuídas entre os diversos grupos e são considerados pigmentos acessórios cuja função é de auxiliar na absorção de luz e na

transferência de energia radiante para os centros de reação (BARSANTI; GUALTIERI, 1952; STREIT et al., 2005; MARQUEZ; BORRMANN, 2009).

A produção de pigmentos a partir de microalgas em escala comercial ainda se restringe a algumas espécies, principalmente aos gêneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Muriellopsis* e *Spirulina* (DERNER et al., 2006; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008; TINOCO; TEIXEIRA; REZENDE, 2015).

4.2.3 Sistemas de Cultivo

Existe uma ampla variedade de configurações que podem ser utilizadas no cultivo de microalgas, o que abrange desde sistemas mais estritamente controlados, como os fotobiorreatores de escalas laboratoriais, até os menos previsíveis, como os tanques expostos ao ar livre ou as lagoas e lagos naturais e/ou artificiais.

Os diferentes sistemas existentes incluem opções com volumes, características e custos variados. Lavens e Sorgeloos (1996) sugerem algumas terminologias para descrever os sistemas de cultivo, como exposto abaixo.

- Interno (fechado) / externo (aberto): o sistema de cultivo interno (fechado) compreende o uso de tubos, frascos, sacos, reatores, etc., onde é possível controlar algumas condições do cultivo como iluminação, temperatura, concentração de nutriente, níveis de contaminação e monitorar a competição com predadores. No sistema externo (aberto), como lagoas e tanques descobertos, os cultivos geralmente são expostos às condições ambientais, portanto há maior dificuldade de se manter uma cultura axênica por muito tempo;
- Estéril/contaminado: culturas estéreis exigem rigorosa esterilização dos meios de cultivo e de todos os materiais que estarão em contato com as culturas. Em escalas comerciais, como o controle de contaminação se torna inexecutável, águas de reúso ou efluentes podem ser utilizados parcial ou totalmente na composição de um meio de cultivo;
- Batelada/contínuo/semicontínuo: o sistema em batelada compreende em realizar cultivos subsequentes em volumes cada vez maiores, de forma gradativa. Quanto ao cultivo contínuo, há duas formas de realizá-lo: diluindo ou concentrando as culturas (controlando a densidade celular no meio) ou

fornecendo teores predeterminados de nutrientes (controlando a taxa de crescimento da cultura). O sistema semicontínuo consiste em coletar periodicamente a cultura desenvolvida e, posteriormente, reajustar a cultura remanescente para que ela cresça novamente e possa ser colhida quando atingido o nível de desenvolvimento desejado.

4.2.4 Condições de Cultivo

As características de diferentes condições de cultivo de microalgas estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características das condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz e/ou composto orgânico	Inorgânico e/ou orgânico
Foto-heterotrófico	Luz	Orgânico

Fonte: adaptado de Chen, Sommerfeld e Hu (2011).

No cultivo fototrófico, a luz (natural ou artificial) é utilizada como fonte de energia e o carbono inorgânico (dióxido de carbono, por exemplo) como fonte de carbono para formar energia química através da fotossíntese. Esta condição é a mais comumente empregada para cultivo de microalgas em sistemas fechados (BORGES, 2010), além de ser considerada atraente quando se deseja aumentar a escala produtiva, pois o gás carbônico gerado em fábricas, por exemplo, pode servir como uma fonte renovável e de baixo custo (CHEN; SOMMERFELD; HU, 2011).

No cultivo heterotrófico, compostos orgânicos são utilizados tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Nesta condição, a luz não é necessária, uma vez que os compostos orgânicos (glicose, acetato, glicerol, frutose, sacarose, lactose e galactose, por exemplo) a substituem, atuando como fonte de energia (CHEN; SOMMERFELD; HU, 2011). Embora possa proporcionar uma elevada produtividade lipídica quando comparada às demais condições, a condição heterotrófica é mais suscetível à contaminação, o que pode se tornar um problema, principalmente em sistemas abertos, quando o objetivo é produção em larga escala.

Quando são utilizados tanto composto orgânico quanto carbono inorgânico como fonte de carbono pela cultura, tem-se o cultivo mixotrófico. Nesta condição, a fonte de energia pode ser proveniente da luz, do próprio composto orgânico, ou de ambas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

O cultivo foto-heterotrófico caracteriza-se pela necessidade de luz como fonte de energia e composto orgânico como fonte de carbono (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014). Os cultivos mixotrófico e foto-heterotrófico se diferem porque o primeiro pode utilizar tanto a luz quanto composto orgânico como fonte de energia, enquanto o último depende apenas da luz para a mesma finalidade (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). Entretanto, as duas condições de cultivo são limitadas pelo risco de contaminação, pela inibição por fonte de carbono ou pela exigência de luz, o que pode exigir um projeto especial de sistema de cultivo, aumentando assim o custo de operação (CHEN; SOMMERFELD; HU, 2011).

4.2.5 Dinâmica de Crescimento

O desenvolvimento de uma cultura axênica de microalgas pode ser caracterizado em cinco fases subsequentes, como descrito por Coutteau (1996):

- (i) Fase *lag* ou fase indução: durante esta fase, a densidade celular aumenta minimamente, sendo relativamente lenta quando há transferência de uma cultura de microalgas de um meio sólido para um meio líquido. Para estirpes que crescem exponencialmente, esta fase é curta, o que possibilita o aumento de escala em tempos mais reduzidos. O atraso no crescimento nesta fase de indução deve-se à adaptação fisiológica do metabolismo celular da microalga, como o aumento da quantidade de enzimas e metabólitos envolvidos na divisão celular e na fixação de carbono.
- (ii) Fase exponencial: fase em que a densidade celular cresce exponencialmente em função do tempo. A taxa de crescimento específico varia conforme a espécie de microalga, da intensidade de luz e da temperatura. A chave para o sucesso da produção é manter as culturas sempre nesta fase.
- (iii) Fase de declínio da taxa de crescimento: uma desaceleração nas divisões celulares ocorre quando nutrientes, luz, pH, dióxido de carbono e outros fatores

começam a limitar o desenvolvimento da cultura, resultando em um decréscimo na taxa de crescimento.

- (iv) Fase estacionária: nesta fase, os fatores limitativos e a taxa de crescimento são balanceados, portanto a densidade celular se torna constante.
- (v) Fase de morte: nesta última fase, uma variedade de razões pode causar a morte das microalgas, como por exemplo, o esgotamento dos nutrientes, a deficiência de oxigênio, o sobreaquecimento, as alterações de pH, ou a presença de contaminantes. A densidade de células decresce rapidamente, a qualidade do cultivo se deteriora e a cultura eventualmente entra em colapso (BOUTERFAS; BELKOURA; DAUTA, 2002; VIEIRA COSTA et al., 2002).

4.2.6 Fatores que Interferem no Desenvolvimento da Cultura

O crescimento de uma população de microalgas é resultado de uma interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (DERNER et al., 2006).

Os fatores biológicos correspondem às taxas metabólicas da espécie cultivada, ao tamanho e densidade das células e à possível presença de outros organismos na cultura de microalgas (OHSE *et al.*, 2007).

Dentre os fatores químicos, destacam-se: a disponibilidade de nutrientes, a salinidade e o pH (LATALA, 1991; SCRAGG et al., 2002; VIEIRA COSTA et al., 2002; DERNER et al., 2006; OHSE et al., 2007). As microalgas requisitam macronutrientes (C, N, O, H, Ca, Mg, S e K) e micronutrientes (Mn, Mo, Fe, Co, Cu, Zn, Se e B) para se desenvolverem. Algumas espécies necessitam, adicionalmente, de vitaminas ou substâncias específicas. Os nutrientes mais utilizados pelas microalgas são o nitrogênio e o fósforo, embora o macronutriente mais importante seja o carbono, por constituir em média 50% da biomassa de microalgas (OHSE et al., 2007; OLIVEIRA, 2009).

Existem diversos meios de cultura que fornecem quantidades adequadas de nutrientes às microalgas. Para produção de microalgas em escala laboratorial, geralmente são utilizados sais de pureza pró-análise (p.a.), enquanto, para cultivos em escalas maiores, fontes residuais e/ou comerciais com valores nutricionais conhecidos podem compor parcial ou totalmente os meios de cultura (ANDRADE; COSTA, 2008; OLIVEIRA, 2009; BAUMGARTNER et al., 2013).

Tem-se constatado em diversas pesquisas que a limitação de nitrogênio e enxofre nos meios de cultivo favorece a síntese de lipídeos em diferentes espécies de microalgas. Em

contrapartida, a deficiência do fósforo demonstrou resultados controversos: aumento do teor lipídico em algumas espécies e diminuição em outras (KHOZIN-GOLDBERG; COHEN, 2006; SAHA; UMA; SUBRAMANIAN, 2003; VERMA et al., 2010).

De acordo com Mata, Martins e Caetano (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010), a resposta às condições de estresse por deficiência nutricional é particular de cada espécie, sendo que a alteração no teor de ácidos graxos e de lipídeos totais pode ocorrer de forma positiva ou negativa.

Para diferentes gêneros de microalgas os teores lipídicos são menores na fase exponencial de crescimento, devido à elevada demanda energética desta fase, mas tendem a aumentar na fase estacionária, quando as células passam a acumular reservas de energia devido à limitação de nutrientes no meio (EMDADI; BERLAND, 1989; FERNÁNDEZ-REIRIZ et al., 1989).

Quanto aos fatores físicos, tem-se que a aeração, o tamanho e a forma dos tanques de cultivo, a luminosidade e a temperatura influenciam o desenvolvimento da cultura (SANTOS; MACEDO; ALEGRE, 2003; SANDNES et al., 2005; AL-QASMI et al., 2012; SINGH; SINGH, 2015).

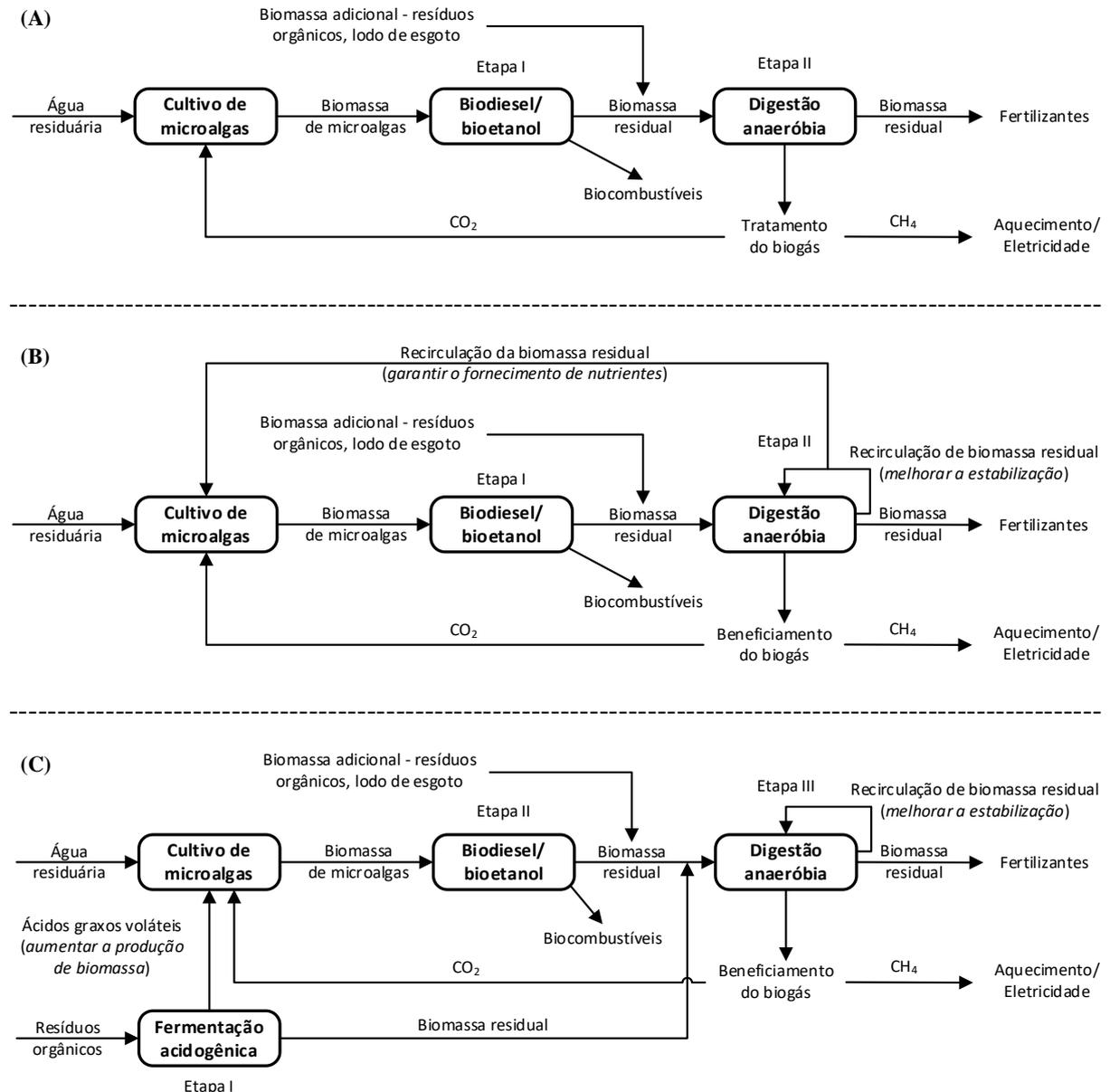
4.3 Resíduo Suíno como Substrato para o Cultivo de Microalgas

Uma estratégia ambientalmente favorável e economicamente interessante para a remoção dos nutrientes de resíduos suínos que tem apresentado grande eficiência é o cultivo de microalgas (WANG et al., 2012; MEZZARI et al., 2013; PRAJAPATI et al., 2013).

O cultivo de microalgas com foco na geração de biomassa pode ter como fonte de nutrientes as águas residuárias (por exemplo, os resíduos da suinocultura) e servir, simultaneamente, como uma forma de tratamento deste efluente, fazendo que seja agregado valor a ambos processos (JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017).

A biomassa de microalgas produzida pode conter alto valor biológico e econômico e, portanto, ser atrativa para aplicações em diversas finalidades (como biodiesel e bioetanol, por exemplo), fundamentando-se no conceito de biorrefinaria (RODRIGUES; FILHO, 2004). A biomassa residual destas aplicações, juntamente com outros materiais orgânicos adicionais, pode ser direcionada ao processo de digestão anaeróbia (Figura 3A). Os componentes do biogás gerado podem ser separados, de forma que o metano sirva para aquecimento ou eletricidade nas próprias instalações do sistema de tratamento e o dióxido de carbono seja destinado ao cultivo de microalgas.

Figura 3 – Conceito de biorrefinaria de microalgas: (A) em duas etapas, para produção de biodiesel, bioetanol e biogás; (B) em duas etapas, com recirculação da biomassa residual (digestato) para melhorar a estabilização; e (C) em três etapas, com fermentação acidogênica para aumentar a produção de biomassa.



Fonte: adaptado de Jankowska, Sahu e Oleskowicz-Popiel (2017).

A biomassa residual da digestão anaeróbia (digestato) pode ser utilizada tanto como fertilizante, quanto como fonte de nutrientes, se for parcialmente recirculada para o cultivo de microalgas. A recirculação para o processo de biodigestão anaeróbia é uma outra alternativa, que pode melhorar a estabilidade, aprimorando o rendimento geral da biorrefinaria (Figura 3B).

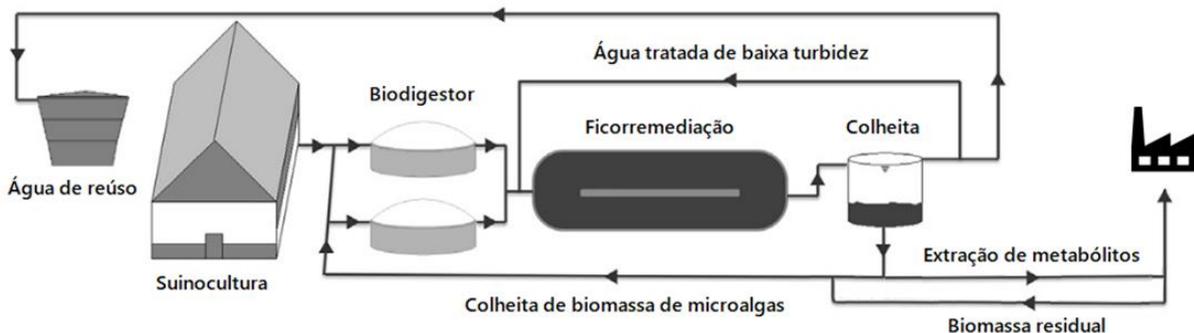
Uma fonte de matéria orgânica externa pode ainda ser direcionada primeiramente à fermentação acidogênica para a produção de ácidos graxos voláteis (Figura 3C), os quais

podem aumentar a carga orgânica no fluxo de água residuária, estimulando a produção de biomassa de microalgas e elevando as taxas de remoção de nutrientes (PRANDINI et al., 2016).

No caso de resíduo suíno, a fim de reduzir as elevadas concentrações de compostos potencialmente inibidores de crescimento de microalgas que podem estar presentes (como ureia, amônio e determinados ácidos orgânicos, por exemplo), a água residuária da suinocultura pode ser submetida primeiramente à biodigestão anaeróbia, aproveitando seu potencial energético com a geração de gases de combustão e, posteriormente, o efluente biodigerido resultante deste processo pode ser utilizado como meio de cultivo para a produção de biomassa de microalgas (Figura 4).

Seguidamente, as microalgas cultivadas no resíduo biodigerido podem ser utilizadas para extração de metabólitos de interesse comercial e, então, a biomassa residual pode ser inserida no interior de um biodigestor juntamente com o resíduo bruto com intuito de aumentar a capacidade de geração de biogás (SIALVE; BERNET; BERNARD, 2009).

Figura 4 – Processo hipotético de tratamento de águas residuárias de suínos com microalgas.



Fonte: adaptado de Perazzoli et al. (2016).

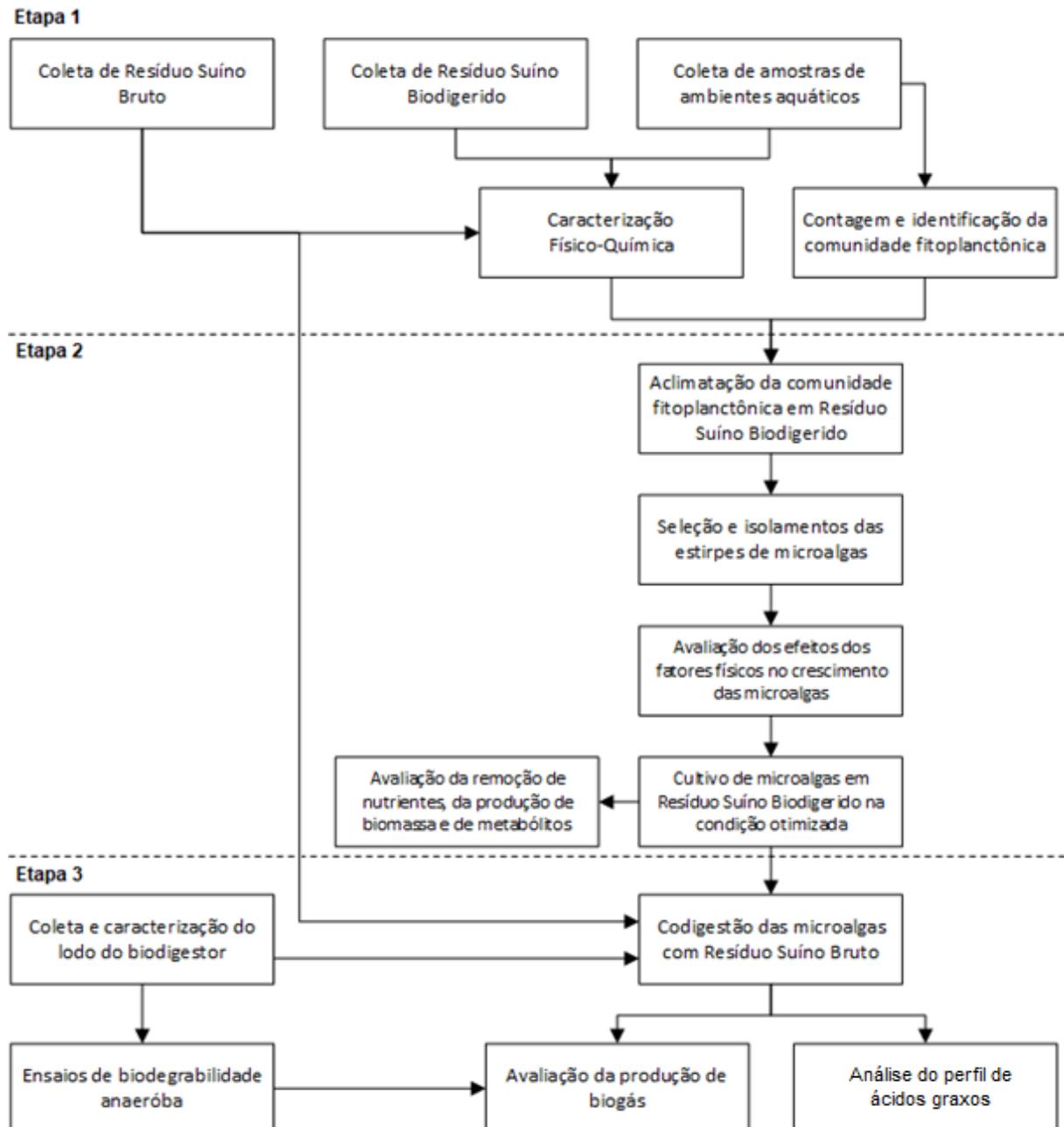
Verifica-se, portanto, a possibilidade de geração de benefício mútuo entre as atividades envolvidas: o resíduo suíno biodigerido pode servir como substrato alternativo para o cultivo de microalgas, ao passo que este efluente pode ser tratado biologicamente devido à remoção de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) pelas microalgas e em seguida, a biomassa gerada ser utilizada para favorecer a produção de biogás por meio da codigestão.

Neste sentido, o vínculo entre estas atividades tende a ser visto como uma estratégia interessante para favorecer a viabilidade econômica e ambiental tanto do tratamento do resíduo suíno quanto do cultivo de microalgas para diversos fins, o que justifica sua aplicação no presente trabalho.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O planejamento da pesquisa divide-se em três etapas, como indicado na Figura 5 e descrito nos itens a seguir.

Figura 5 – Fluxograma experimental.



Fonte: próprio autor.

5.1 Etapa 1 – Coleta e Caracterização dos Resíduos e das Amostras Ambientais

5.1.1 Caracterização do local de coleta

O resíduo suíno biodigerido e as amostras de ambientes aquáticos foram coletados na Fazenda Santo Ignácio de Loyola, no município de Brotas – SP (22°14'12.0"S, 47°58'06.3"W).

Na Fazenda, o modelo produtivo de suínos é independente e o sistema de operação é de ciclo completo, compreendendo desde a etapa de gestação dos suínos até a de terminação.

Em piso de concreto, são confinados entre 22 e 23 mil suínos que produzem cerca de 250.000 L dia⁻¹ de dejetos líquidos. Estes dejetos são encaminhados a um tanque de sedimentação, onde permanecem por um período indeterminado e então são remetidos a três biodigestores anaeróbios presentes no local.

A fração sólida dos dejetos, obtida das granjas ou do tanque de sedimentação, é submetida à compostagem na própria propriedade, por meio da mistura com outros tipos de materiais. O digestato é encaminhado para uma lagoa de estabilização e, então, utilizado como biofertilizante agrícola conforme a necessidade.

O biogás produzido nos biodigestores (900 a 1.000 m³ dia⁻¹) é composto de cerca de 60% de metano e utilizado como fonte complementar de energia no próprio empreendimento (energia equivalente a 858 kWh dia⁻¹, desconsiderando perdas).

5.1.2 Coleta do Resíduo Suíno Bruto e Biodigerido

Em agosto de 2017, os resíduos líquidos oriundos das granjas de criação de suínos foram coletados na entrada (resíduo bruto) e na saída (resíduo biodigerido) de um dos biodigestores pertencentes à Fazenda Santo Ignácio de Loyola (Figura 6A).

Os volumes coletados foram: 20 L de resíduo suíno bruto e 30 L de resíduo suíno biodigerido. Estes conteúdos foram armazenados em galões de polietileno e foram levados ao Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), na Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos - SP, onde foram conservados em câmara fria (3 ± 1 °C) até o momento de seu uso.

5.1.3 Coleta das Amostras de Ambientes Aquáticos

Na mesma data de coleta de resíduos e na mesma propriedade, foram coletados 2 L de amostras de cada um dos ambientes aquáticos: (i) lagoa de águas continentais (Figura 6B) e (ii) espelho d'água formado sobre a lona de um biodigestor (Figura 6C).

Figura 6 – Pontos de coleta de amostras de resíduos suínos e de ambientes aquáticos: (A) biodigestor (entrada e saída); (B) lagoa de águas continentais e (C) espelho d'água formado sobre a lona de um biodigestor.



Fonte: próprio autor.

5.1.4 Caracterização Físico-Química dos Resíduos e das Amostras Ambientais

As variáveis mensuradas na caracterização físico-química (Quadro 2) seguiram as metodologias descritas em APHA (2005), com exceção do nitrito (N-NO_2^-), que seguiu o método proposto por Mackereth, Heron e Talling (1978).

Para as determinações de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade foram utilizados, respectivamente, termômetro de mercúrio (Incoterm®, 5005), oxímetro (Digimed®, DM-4), pHmetro (Tecnal®, TEC-2mp) e condutivímetro (Digimed®, DM-32). Para as análises espectrofotométricas, foi utilizado espectrofotômetro (HACH®, DR4000) equipado com luz ultravioleta. Para determinações de NTK e N-amoniaco foi utilizado sistema automatizado (Buchi®, digestor automático K-438, unidade Kjeldahl automática K-370 e scrubber B-414).

Quadro 2 – Variáveis físico-químicas com seus respectivos métodos de determinação.

Variável	Método de determinação e Referência
Temperatura	Termo-resistivo Método 2550 - APHA (2005)
Oxigênio Dissolvido	Potenciométrico Método 4500-O G - APHA (2005)
pH	Potenciométrico Método 4500-H ⁺ B - APHA (2005)
Condutividade	Potenciométrico Método 2510 B - APHA (2005)
Alcalinidade	Titulométrico Método 2320 B - APHA (2005)
SST, SSO e SSI	Gravimétrico Método 2540 D - APHA (2005) Método 2540 E - APHA (2005)
P-Total	Espectrofotométrico Método 4500-P B - Digestão com persulfato - APHA (2005) Método 4500-P E - Ácido ascórbico - APHA (2005)
P-PO ₄ ³⁻	Espectrofotométrico Método 4500-P E - Ácido ascórbico - APHA (2005)
NTK	Titulométrico Método 4500-Norg C – Semi-Micro-Kjeldahl - APHA (2005)
N-amoniaco (N-NH ₄ ⁺ + N-NH ₃)	Método 4500NH ₃ B – Destilação - APHA (2005) Método 4500-NH ₃ C – Titulométrico - APHA (2005)
N-NO ₃ ⁻	Espectrofotométrico Método 4500-NO ₃ B – Varredura no ultravioleta - APHA (2005)
N-NO ₂ ⁻	Espectrofotométrico - Mackereth, Heron, Talling (1978)
CTD, COD e CID	Método 5310 B - Combustão à alta temperatura - APHA (2005)
DBO _{5,20}	Método 5210 B - Teste do quinto dia - APHA (2005)
DQO	Colorimétrico Método 5220 D - Refluxo fechado - APHA (2005)

Nota: SST: Sólidos Suspensos Totais; SSO: Sólidos Suspensos Orgânicos; SSI: Sólidos Suspensos Inorgânicos; P-Total: fósforo total; P-PO₄³⁻: ortofosfato; NTK: Nitrogênio Total Kjeldahl; N-amoniaco: nitrogênio amoniaco; N-NO₂⁻: nitrito; N-NO₃⁻: nitrato; CTD: Carbono Total Dissolvido; COD: Carbono Orgânico Dissolvido; CID: Carbono Inorgânico Dissolvido; DBO_{5,20}: Demanda Bioquímica de Oxigênio no quinto dia, a 20 °C; DQO: Demanda Química de Oxigênio.

Fonte: próprio autor.

5.1.5 Contagem e Identificação da Comunidade Fitoplanctônica das Amostras Ambientais

Frações das amostras coletadas dos ambientes aquáticos foram fixadas com 5% de formaldeído-40% e, a partir delas, foi realizada a contagem de células por meio da utilização da câmara de Fuchs-Rosenthal disposta em microscópio óptico (Olympus®, BX 51).

A densidade fitoplanctônica foi calculada segundo APHA (2005) – Método 10200F. Para identificação, foram utilizadas chaves de identificação disponíveis na literatura (BICUDO; MENEZES, 2006; KOMÁREK; FOTT, 1983; PARRA et al., 1982).

5.2 Etapa 2 – Aclimação e Cultivo de Microalgas em Resíduo Suíno Biodigerido

5.2.1 Ensaios de Aclimação

Em frascos Duran (500 mL), suspensões de microalgas originadas das amostras ambientais foram inoculadas na proporção de 10% (v/v) em relação às diferentes misturas compostas por Resíduo Suíno Biodigerido (RSBio) (previamente filtrado em papel filtro com capacidade de retenção de partículas de 4 a 12 μm) e meio de cultivo WC (pH previamente ajustado para 7,8) (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição do meio de cultivo WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972).

Componente	Concentração (mg L^{-1})	Elemento	Concentração final (μM)
<i>Solução tampão</i>			
Tris	500	-	4130
<i>Macronutrientes</i>			
NaNO_3	85,01	N- NO_3 : 14 mg L^{-1}	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,76	Ca: 10,019 mg L^{-1}	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36,97	Mg: 3,65 mg L^{-1}	150
NaHCO_3	12,60	HCO_3 : 9,15 mg L^{-1}	150
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	28,42	Si: 2,81 mg L^{-1}	100
K_2HPO_4	8,71	P- PO_4 : 1,55 mg L^{-1}	50
<i>Micronutrientes</i>			
Na_2EDTA	4,36	-	11,7
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,15	Fe: 0,65 mg L^{-1}	11,7
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	Cu: 2,5 mg L^{-1}	0,0401
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022	Zn: 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0765
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	Co: 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,042
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,18	Mn: 0,05 mg L^{-1}	0,91
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006	Mo: 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,0248
H_3BO_3	1,00	B: 0,17 mg L^{-1}	16,2
<i>Solução de vitaminas</i>			
	($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Tiamina. HCl (vitamina B ₁)	100	-	0,296
Biotina (vitamina H)	0,5	-	0,00205
Cianocobalamina (vitamina B ₁₂)	0,5	-	0,000369

Fonte: Andersen (2005).

As proporções (v/v) de RSBio nas misturas RSBio+WC foram: 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 35%, 50%, 60%, 80 e 100% (Tabela 7).

Com exceção da primeira inoculação de microalgas (fase $f=1$), realizada com uma fração proveniente diretamente das amostras ambientais, as demais fases ocorreram de forma sequenciada, coletando-se 10% do volume do cultivo obtido ao final de uma fase (f) e utilizando-a como inóculo para o cultivo de uma nova fase ($f+1$).

Tabela 7 – Descrição das fases de aclimação, com seus respectivos volumes utilizados de RSBio, de meio de cultivo WC e de inóculo de microalgas.

Fase f	RSBio/(RSBio+WC) (%)	Vol. RSBio (mL)	Vol. WC (mL)	Vol. inóculo de microalgas (mL) *	Vol. Total (mL)
1	1	2,25	222,75	25	250
2	2	4,50	220,50	25	250
3	5	11,25	213,75	25	250
4	10	22,50	202,50	25	250
5	25	56,25	168,75	25	250
6	35	78,75	146,25	25	250
7	50	112,50	112,50	25	250
8	60	135,00	90,00	25	250
9	80	180,00	45,00	25	250
10	100	225,00	0,00	25	250

Fonte: próprio autor.

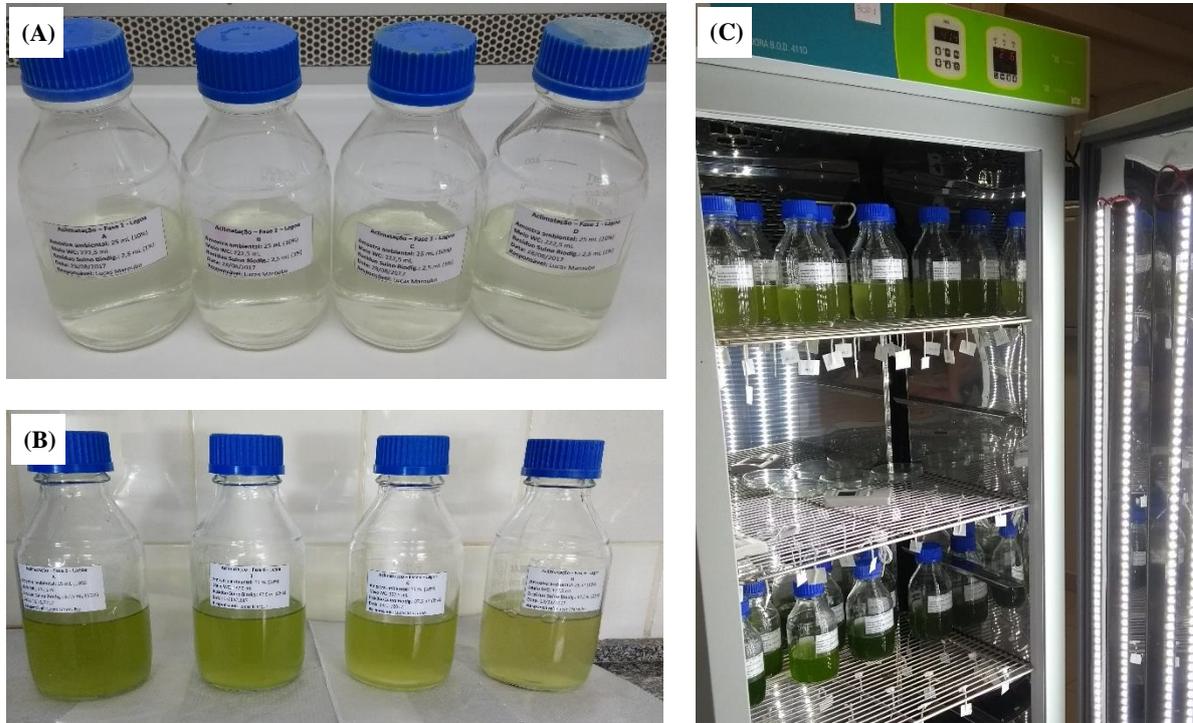
Nota: * 10% do volume total. Na fase $f=1$, o inóculo foi proveniente das amostras ambientais. Nas fases $f>1$, o inóculo foi proveniente do crescimento obtido ao final da fase imediatamente anterior ($f-1$).

Cada fase correspondeu ao período de 15 dias, em que os frascos foram mantidos em incubadora (Nova Ética, BOD 411D) adaptada com iluminação à LED (*Light Emitting Diode*)⁶ promovendo $110 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e ajustada a 24 °C, com fotoper\u00edodo claro/escuro de 12h/12h (Figura 7).

Em todas as fases, foram realizadas quatro repeti\u00e7\u00f5es para cada tratamento, sendo avaliada a toler\u00e2ncia das microalgas \u00e0s diferentes concentra\u00e7\u00f5es de res\u00edduo su\u00edno biodigerido, por meio da compara\u00e7\u00e3o da abund\u00e2ncia relativa entre as estirpes.

⁶ Intensidade luminosa mensurada com LI-COR LI-190R Quantum Sensor acoplado ao dispositivo LI-COR LI-1500 Light Sensor Logger.

Figura 7 – Ensaio de aclimação das amostras ambientais: (A) primeiro dia da fase 1 de aclimação da amostra proveniente da lagoa (quatro repetições); (B) primeiro dia da fase 6 de aclimação da amostra proveniente da lagoa (quatro repetições); e (C) amostras ambientais em incubadora com controle de iluminação, fotoperíodo e temperatura.



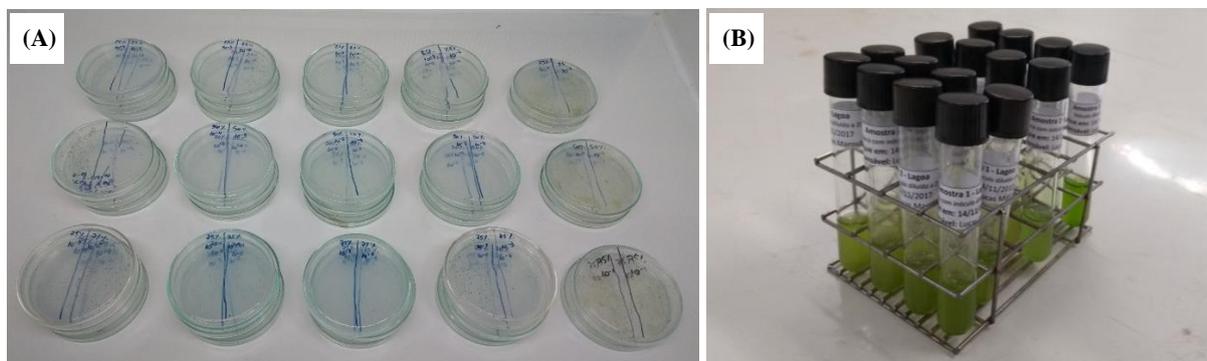
Fonte: próprio autor.

5.2.2 Seleção e Isolamento das Estirpes de Microalgas

Foram selecionadas as estirpes de microalgas mais tolerantes aos RSBio (mais abundantes na maiores concentrações de efluente) e realizado o isolamento destas pelo método de diluições em série seguido de espalhamento e esgotamento em placas de Petri (HOSHAW; ROSOWISKI, 1973) contendo meio WC solidificado com 1% de ágar (Figura 8A).

Após incubação das placas de Petri, em sala de cultivo, por tempo suficiente para que fosse verificado o crescimento, as colônias crescidas foram observadas em microscópio invertido (Olympus®, CKX 41) e, após sua identificação, foram inoculadas, com auxílio de agulha estéril, em tubos de ensaio (50 mL) contendo 20 mL de meio WC líquido (Figura 8B).

Figura 8 – Etapas do isolamento das estirpes: (A) amostras em crescimento, após serem inoculadas pelo método do espalhamento em placas de Petri contendo meio WC solidificado com 1% de ágar; e (B) estirpes inoculadas isoladamente em tubos de ensaio (50 mL) contendo meio WC líquido.



Fonte: próprio autor.

As estirpes isoladas nos tubos foram mantidas em ambiente climatizado (24 °C, 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h/12h) durante o decorrer da pesquisa, pois constituíam o banco de microalgas que seria utilizado nos ensaios subsequentes, cuja manutenção (reposição do meio de cultura) foi realizada a cada três meses, conforme recomendado por Day, Benson e Fleck (1999).

5.2.3 Avaliação dos Efeitos de Fatores Físicos no Crescimento das Microalgas

Um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi aplicado com intuito de avaliar os efeitos da temperatura e da luminosidade no crescimento de uma estirpe de microalga (selecionada no item 5.2.2) quando cultivada em RSBio. O ensaio foi composto por 9 tratamentos, sendo executadas três repetições por tratamento, exceto no ponto central (T5), que contemplou 12 replicatas (Figura 9).

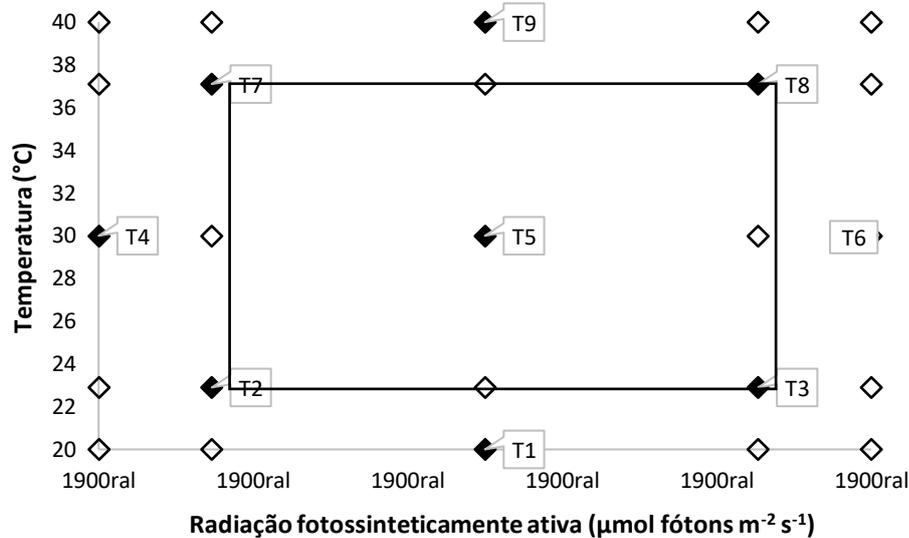
Os níveis codificados e reais dos fatores investigados estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Fatores e níveis investigados nos experimentos planejados com DCCR.

Fatores	Níveis codificados e reais				
	-1,4142	-1	0	1	1,4142
Temperatura (°C)	20,0	22,9	30,0	37,1	40,0
Luminosidade (μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (fotoperíodo 12h/12h)	0,0	36,6	125,0	213,4	250,0

Fonte: próprio autor.

Figura 9 – Representação do Delineamento Composto Central Rotacional aplicado para avaliação dos efeitos de temperatura e luminosidade no crescimento das microalgas.



Fonte: próprio autor.

Nota: Pontos pretos representam os tratamentos executados no DCCR (de T1 a T9). Pontos pretos conectados por linhas representam o planejamento fatorial 2^2 do DCCR adicionados por quatro pontos axiais pretos e um ponto preto central, totalizando 9 tratamentos. Os pontos brancos representam os tratamentos totais se o planejamento fatorial fosse completo e com 5 níveis ($5^2 = 25$ tratamentos).

Os experimentos tiveram duração de 17 dias e foram conduzidos em tubos de ensaio (50 mL) contendo 20 mL de cultura de microalgas, que foram acondicionados em incubadoras (Nova Ética, BOD 411D) adaptadas com iluminação à LED e fotoperíodo claro/escuro ajustado para 12h/12h. A densidade celular de microalgas foi ajustada inicialmente para $1,3 \times 10^7$ células mL^{-1} em todos os experimentos, com uso da regressão linear entre densidade celular e absorbância, e os tubos foram posicionados nas prateleiras das incubadoras de acordo com a descrição de cada tratamento, para que pudessem atender às condições de temperatura e luminosidade delineadas.

Para o monitoramento do crescimento das culturas, leituras espectrofotométricas na região de absorção da clorofila *a* ($\lambda = 683$ nm) foram realizadas diariamente, sendo os dados normalizados para escala logarítmica (Equação 1), conforme recomendações de Zwietering et al. (1990), para obter a amplitude de crescimento (A_c) (maior valor de crescimento observado).

$$y = \ln(X/X_0) \quad (1)$$

Em que:

y é o valor correspondente ao crescimento (unidade adimensional – u.a.);

X é a determinação de densidade óptica do dia de interesse de cultivo (abs); e X_0 é a determinação de densidade óptica no dia 0 (abs).

Em seguida, os dados foram ajustados ao modelo de Gompertz (Equação 2) para então ser obtida a velocidade de crescimento específico máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) (Equação 3).

$$y = a \cdot e^{-e^{-b \cdot (x-x_c)}} \quad (2)$$

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{a \cdot k}{e} \quad (3)$$

Os resultados foram submetidos às análises de variância (ANOVA), de superfícies de resposta, para determinar a faixa ótima de cultivo, e do teste de Tukey (5%), para comparação de médias.

A validação da otimização consistiu em realizar o cultivo das estirpes nas condições ótimas previstas pelo modelo e comparar os resultados obtidos neste ensaio com os do modelo.

5.2.4 Avaliação da remoção de nutrientes e da produção de biomassa e metabólitos

Para avaliar a remoção de nutrientes do RSBio por meio do cultivo de microalgas e a consequente produção de biomassa e de metabólitos, uma estirpe de microalga (selecionada no item 5.2.2) foi incubada na melhor condição de luminosidade e temperatura validada no ensaio descrito no item 5.2.3, tendo como fator de variação a concentração de microalgas inoculadas em RSBio. Sendo assim, foram definidos quatro tratamentos, com inóculos iniciais de 0, 1, 4 e 6 ($\times 10^6$ células mL^{-1}), denominados RSBio0, RSBio10, RSBio40 e RSBio60, respectivamente.

Este ensaio também foi realizado em incubadora (Nova Ética, BOD 411D) adaptada com iluminação à LED e fotoperíodo claro/escuro ajustado para 12h/12h, sendo cada tratamento executado em triplicata, utilizando frascos Duran (2,0 L) contendo 1,5 L de cultivo que foram agitados diariamente de forma manual e reposicionados de forma aleatória na incubadora por 18 dias (Figura 10).

Ao longo do período de cultivo, amostras de cada frasco foram coletadas periodicamente para a determinação de parâmetros físico-químicos e de monitoramento da biomassa, conforme descrito no Quadro 3.

Figura 10 – Incubação do ensaio da avaliação da remoção de nutrientes do RSBio e da produção de biomassa e metabólitos.



Fonte: próprio autor.

Quadro 3 – Parâmetros avaliados, periodicidade das análises, métodos e referências utilizadas.

Parâmetro	Periodicidade (dias após o início do experimento)	Método de determinação e Referência
Biomassa	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	SST - Método 2540 D e E - APHA (2005) e Densidade Óptica em $\lambda = 683 \text{ nm}$
Clorofila <i>a</i>	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Nusch (1980), adaptado por NEN (2006)
pH	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Método 4500-H ⁺ B - APHA (2005)
DQO	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Método 5220 D - APHA (2005)
N-amoniacoal (N-NH ₄ ⁺ + N-NH ₃)	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Método 4500-NH ₃ B - APHA (2005) Método 4500-NH ₃ C - APHA (2005)
P-PO ₄ ³⁻	0 / 1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Método 4500-P E - APHA (2005)
Lipídeo	0 / 18	Bligh e Dyer (1959), adaptado por Ryckebosch, Muylaert e Foubert (2012)
Proteína	1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Lowry et al. (1951)
Carboidrato	1 / 2 / 3 / 5 / 7 / 9 / 12 / 15 / 18	Dubois et al. (1956); Gerhacov e Hatcher (1972), adaptado por Blundi e Gadelha (2001)

Fonte: próprio autor.

Em cultivos realizados em tubos de ensaio contendo *Chlorella sorokiniana* em RSBio, foram relacionadas, ao longo do tempo, as quantidades de sólidos suspensos totais,

determinadas de acordo com APHA (2005), com as leituras espectrofotométricas na região de absorção da clorofila *a* ($\lambda = 683$ nm). Desta forma, foi obtida uma regressão linear entre biomassa e absorbância.

Portanto, nesta etapa da pesquisa, a biomassa foi estimada por meio de leituras de densidade óptica das amostras ($\lambda = 683$ nm) e seu uso na regressão linear obtida.

5.3 Etapa 3 – Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia e de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto

5.3.1 Coleta e Caracterização do Lodo do Biodigestor

Em abril de 2019, foram coletados 5 L de lodo de um biodigestor localizado na Fazenda Santo Ignácio de Loyola, em Brotas - SP (22°14'12.0"S, 47°58'06.3"W). Este volume foi armazenado em galão de polietileno que, em seguida, foi levado ao Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), na Universidade de São Paulo (USP), em São Carlos - SP, onde foi conservado em câmara fria (3 ± 1 °C) até o momento de seu uso.

Os parâmetros considerados para a caracterização do lodo foram pH, mensurado com auxílio de um pHmetro (Tecnal®, TEC-2mp); DQO, determinada conforme o método 5220D (APHA, 2005) e sólidos orgânicos, inorgânicos e totais, determinados pelo método 2540 D e E (APHA, 2005).

5.3.2 Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia

O ensaio de biodegradabilidade anaeróbia consistiu em uma análise exploratória do potencial de biodegradação das microalgas pela ação dos microrganismos presentes no lodo extraído do biodigestor de resíduo suíno bruto. Para tanto, reatores em batelada foram montados utilizando-se frascos Duran (500 mL), sendo preparados com base na capacidade volumétrica real destes frascos (575 mL), de modo que um terço do volume (192 mL) fosse ocupado pelo meio reacional e dois terços (383 mL) fosse deixado como *headspace*.

Para o preparo do meio reacional, suspensões de uma estirpe de microalga (selecionada no item 5.2.2) foram introduzidas nos frascos a fim de se obter as concentrações de 0, 2 e 4 ($\times 10^6$ células mL⁻¹) em relação a uma mistura composta por lodo de biodigestor e

Meio Mineral Del Nery (MMDN) (Tabela 9), correspondendo aos quatro tratamentos listados na Tabela 10, realizados em triplicata.

O MMDN corresponde a uma solução de micronutrientes utilizada para a suplementação nutricional, visando a geração e crescimento da biomassa.

Tabela 9 – Concentração dos micronutrientes no Meio Mineral Del Nery (MMDN).

Solução	Componente	Concentração (mg L⁻¹) com base em 1 g DQO L⁻¹	
A	Sulfato de níquel	NiSO ₄ ·H ₂ O	0,25
	Sulfato ferroso	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,25
	Sulfato férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,125
	Cloreto de cálcio	CaCl ₂ ·6H ₂ O	1,03
B	Cloreto de cobre	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,020
C	Dióxido de selênio	SeO ₂	0,018
D	Fosfato de potássio monobásico	KH ₂ PO ₄	2,68
	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	0,65
	Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	1,35

Fonte: Del Nery (1987).

Tabela 10 – Descrição dos tratamentos do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.

Tratamento	Concentração de microalgas (células mL⁻¹; v/v)	Microalga (mL)	Lodo (mL)	MMDN* (mL)	Total (mL)
Lodo0	0; 0%	0,0	30,0	162,0	192,0
Lodo20	2x10 ⁶ ; 20%	38,4	30,0	123,6	192,0
Lodo40	4x10 ⁶ ; 40%	76,8	30,0	85,2	192,0

Fonte: próprio autor.

Nota: preparado com base na carga orgânica de 2 g DQO L⁻¹ (equivalente a 1,875 g glicose L⁻¹), característica geral do cultivo de microalgas utilizado como suspensão.

Após o preparo, o volume interno de cada frasco foi saturado com nitrogênio gasoso (N₂) por 5 min e, em seguida, os frascos foram vedados com tampa butílica e mantidos por 48 dias em incubadora (New Brunswick Scientific®, *Incubator Shaker Series I26*), protegido da luz, sob temperatura de 37 °C e agitação contínua de 100 rpm (Figura 11) sendo manuseados somente nos momentos das coletas de amostras do biogás, conforme descrito na Tabela 11.

Figura 11 – Reatores dispostos em incubadora durante o ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.

Fonte: próprio autor.

Tabela 11 – Frequência de amostragem do biogás no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.

Período	Frequência
Do dia 0 ao dia 2	A cada 4 h
Do dia 2 ao dia 4	A cada 6 h
Do dia 4 ao dia 7	A cada 8h
Do dia 7 ao dia 9	A cada 12 h
Do dia 10 em diante	A cada 24 h

Fonte: próprio autor.

5.3.2.1 Avaliação da produção de biogás

Para amostragem, o biogás era coletado com auxílio de uma seringa (1 mL) acoplada a uma trava de segurança e a uma agulha descartável (40 x 1,20 mm) que, por sua vez, era introduzida na tampa butílica dos frascos. Desta forma, um volume conhecido de biogás era coletado e injetado no cromatógrafo (Shimadzu Scientific Instruments®, GC-2014) para a quantificação das frações do biogás.

Previamente a cada análise cromatográfica, com auxílio de um manômetro digital (Desin Instruments®, transdutor de pressão TPR-18 acoplado à interface BS 2200), verificava-se a pressão interna dos reatores em batelada, o que permitia, além de avaliar indiretamente a produção de biogás, reduzir o risco de explosão dos frascos devido ao aumento da pressão gerada pelo acúmulo dos gases. Assim, nos casos em que a pressão

interna se encontrava muito elevada (≥ 350 mbar), realizava-se a coleta do biogás para a análise de sua composição e, em seguida, a depressurização dos frascos e o retorno destes à incubadora.

A cada amostragem, em posse da fração molar de metano no biogás (X_{CH_4}), obtida pela análise cromatográfica e, com base nos dados de pressão interna do reator (P), volume do *headspace* (V), constante universal dos gases ideais (R) e temperatura de operação (T), foi possível obter, por meio da Lei dos Gases Ideais, o número de moles do gás metano (n_{CH_4}) (Equação 4) e, em seguida, seu volume convertido às Condições Normais de Temperatura e Pressão (V_{CH_4CNTP}) (Equação 5).

$$n_{CH_4} = \left(\frac{P \cdot V}{R \cdot T} \right) \cdot X_{CH_4} \quad (4)$$

$$V_{CH_4CNTP} = \frac{n_{CH_4} \cdot R \cdot T_{CNTP}}{P_{CNTP}} \quad (5)$$

Desta forma, foi possível obter o volume acumulado de metano produzido ao longo do ensaio, somando-se o volume observado a cada amostragem.

5.3.3 Ensaio de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto

O ensaio de codigestão foi desenvolvido utilizando-se reatores em batelada montados em frascos Duran (2 L), preparados com base na capacidade volumétrica real destes frascos (2.295 mL), sendo que dois terços do volume (1.530 mL) foi ocupado pelo meio reacional e um terço (765 mL) foi deixado como *headspace*.

Para o preparo do meio reacional, suspensões de uma estirpe de microalga (*Chlorella sorokiniana*, selecionada no item 5.2.2) foram introduzidas nos frascos a fim de se obter as concentrações de 0, 4 e 6 ($\times 10^6$ células mL^{-1}) em relação a uma mistura composta por lodo de biodigestor e Resíduo Suíno Bruto (RSBru), correspondendo aos três tratamentos listados na Tabela 12, realizados em triplicata.

Tabela 12 – Descrição dos tratamentos do ensaio de codigestão de microalgas com Resíduo Suíno Bruto.

Tratamento	Concentração de microalgas (células mL ⁻¹ ; v/v)	Microalga (mL)	Lodo (mL)	RSBru (mL)	Total (mL)
RSBru0	0; 0%	0,0	283,0	1247,0	1.530,0
RSBru40	4x10 ⁶ ; 40%	612,0	283,0	635,0	1.530,0
RSBru60	6x10 ⁶ ; 60%	918,0	283,0	329,0	1.530,0

Fonte: próprio autor.

Após o preparo, o volume interno de cada frasco foi saturado com gás argônio (Ar) por 5 min e, em seguida, os frascos foram vedados com tampa butílica e mantidos por 58 dias em câmara de crescimento sobre um agitador de mesa (Ethik Technology®, mod. 109), protegido da luz, sob temperatura de 37 °C e agitação contínua de 100 rpm (Figura 12), sendo manuseados somente nos momentos das coletas de amostras do biogás, conforme descrito na Tabela 13.

Figura 12 – Reatores em batelada dispostos sobre mesa agitadora inserida em câmara de crescimento durante o ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Tabela 13 – Frequência de amostragem do biogás no ensaio de codigestão de microalgas com Resíduo Suíno Bruto.

Período	Frequência
Do dia 0 ao dia 2	A cada 4 h
Do dia 3 ao dia 5	A cada 6 h
Do dia 5 ao dia 7	A cada 8h
Do dia 7 ao dia 9	A cada 12 h
Do dia 9 ao dia 20	A cada 24 h
Do dia 20 ao dia 25	A cada 48 h
Do dia 25 a dia 40	A cada 72 h
Do dia 40 ao dia 48	A cada 96 h
Do dia 48 em diante	A cada 10 dias

Fonte: próprio autor.

5.3.3.1 Avaliação da produção de biogás

Para amostragem, o biogás era coletado com auxílio de uma seringa (1 mL) acoplada a uma trava de segurança que se encaixava em uma válvula de três vias previamente instalada na tampa butílica dos frascos.

A quantificação do biogás seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 5.3.2.1.

5.3.3.2 Análise do perfil de ácidos graxos

Ao longo do ensaio, foram realizadas oito amostragens da fração líquida para o monitoramento da concentração dos ácidos graxos. A análise foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; em inglês: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) em um sistema Shimadzu® com detectores de UV/DAD.

No cromatógrafo, utilizou-se coluna Aminex HPX-87H, de 300 mm x 7,8 mm. O efluente empregado no método foi H₂SO₄ 0,005M, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura do forno de 43 °C.

Para evitar obstrução da coluna do cromatógrafo, as amostras receberam o seguinte pré-tratamento: centrifugação a 9.000 rpm por 5 min, seguida de filtração em membrana de 0,2 µm de porosidade, diluição em água destilada na proporção de 1:4. Em seguida, 1 mL da amostra pré-tratada foi transferida a um *vial*, onde foi adicionado 0,4 µL de H₂SO₄ 2M. Após

serem fechados, os *vials* foram acondicionados em um amostrador automatizado que, por sua vez, foi inserido no aparelho para que pudessem ser determinadas as concentrações de ácidos graxos.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização dos Resíduos Suínos e das Amostras Ambientais

Os resultados da caracterização físico-química dos resíduos suínos (bruto e biodigerido), bem como das amostras ambientais (lagoa e espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor) estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14 – Caracterização físico-química das amostras coletadas.

Variável	Resíduo Suíno Bruto	Resíduo Suíno Biodigerido	Lagoa	Espelho d'água formado sobre lona de biodigestor
Temperatura (°C)	22,0	21,0	21,0	25,0
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	0,00	0,00	6,23	5,85
pH	7,15	7,16	6,64	6,75
Condutividade (µS cm ⁻¹)	3.596,00	1.938,90	60,67	75,37
Alcalinidade ao pH 4,3 (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	1.069,07	1.550,47	13,76	64,59
SST (mg L ⁻¹)	2.816,67	1.010,00	13,50	67,50
SSO (mg L ⁻¹)	2.783,34	885,00	12,50	59,50
SSI (mg L ⁻¹)	33,33	125,00	1,00	8,00
P-Total (mg L ⁻¹)	62,33	79,70	0,61	0,83
P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	33,93	64,76	0,03	0,04
NTK (mg L ⁻¹)	239,14	292,85	3,54	8,23
N-amoniacoal (N-NH ₄ ⁺ + N-NH ₃) (mg L ⁻¹)	228,25	287,82	0,89	0,30
N-NO ₃ (mg L ⁻¹)	74,97	39,12	5,16	4,50
N-NO ₂ (µg L ⁻¹)	161,33	124,85	13,19	9,56
CTD (mg L ⁻¹)	1.767,33	622,30	8,54	41,85
COD (mg L ⁻¹)	1.765,71	620,69	8,18	40,59
CID (mg L ⁻¹)	1,62	1,61	0,36	1,26
DBO _{5,20} (mg L ⁻¹)	2.940,00	2.180,00	17,44	*
DQO (mg L ⁻¹)	8.421,00	3.650,60	33,0	41,0

Fonte: próprio autor.

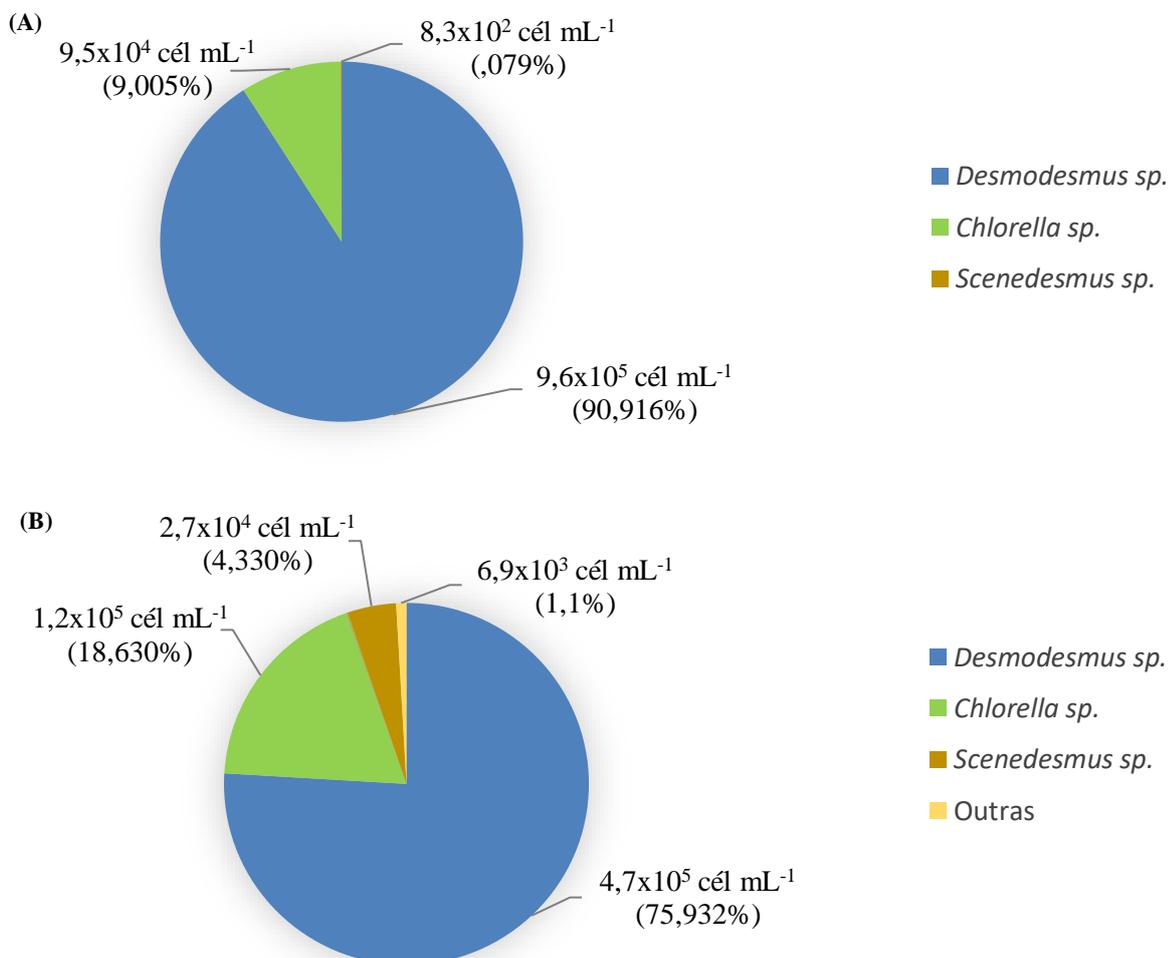
Nota: *: não mensurado.

6.2 Avaliação Quantitativa e Qualitativa da Comunidade Fitoplanctônica das Amostras Ambientais

Nas amostras da lagoa de águas continentais, a presença de *Desmodesmus* sp. ($9,6 \times 10^5$ células mL^{-1}), *Chlorella* sp. ($9,5 \times 10^4$ células mL^{-1}) e *Scenedesmus* sp. ($8,3 \times 10^2$ células mL^{-1}) foram observados, representando 90,9%, 9,0% e 0,1% da comunidade fitoplanctônica da amostra, respectivamente (Figura 13A).

Nas amostras do espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor, as espécies mais abundantes também foram *Desmodesmus* sp. ($4,7 \times 10^5$ células mL^{-1}), seguido por *Chlorella* sp. ($1,2 \times 10^5$ células mL^{-1}) e *Scenedesmus* sp. ($2,7 \times 10^4$ células mL^{-1}), representando 75,9%, 18,6% e 4,3% da comunidade fitoplanctônica da amostra, respectivamente. As demais espécies correspondem a $6,9 \times 10^3$ células mL^{-1} , representando 1,1% da amostra (Figura 13B).

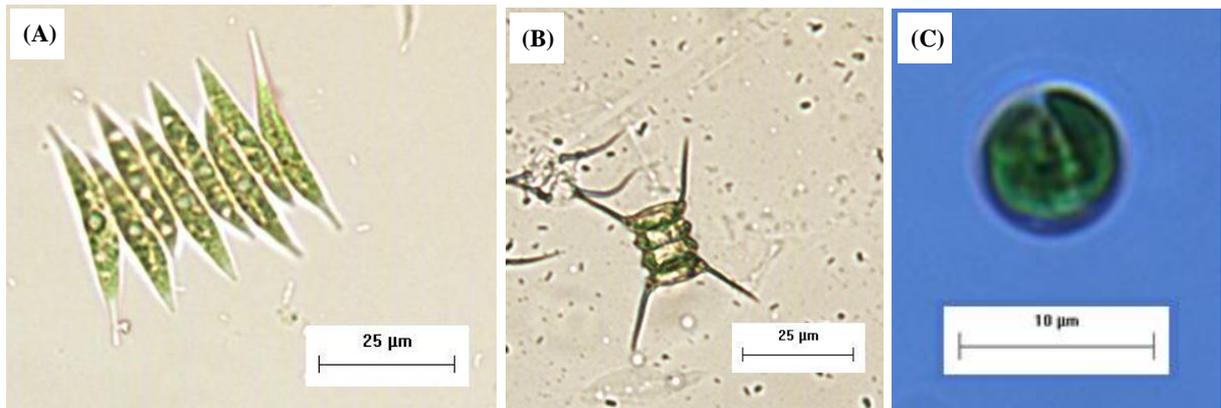
Figura 13 – Abundância relativa da comunidade fitoplanctônica das amostras coletadas: (A) lagoa de águas continentais; e (B) espelho d'água formado na lona do biodigestor.



Fonte: próprio autor.

As fotomicrografias dos microrganismos fitoplanctônicos observados nas amostras da lagoa de águas continentais e do espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor estão dispostas nas Figuras 14 e 15.

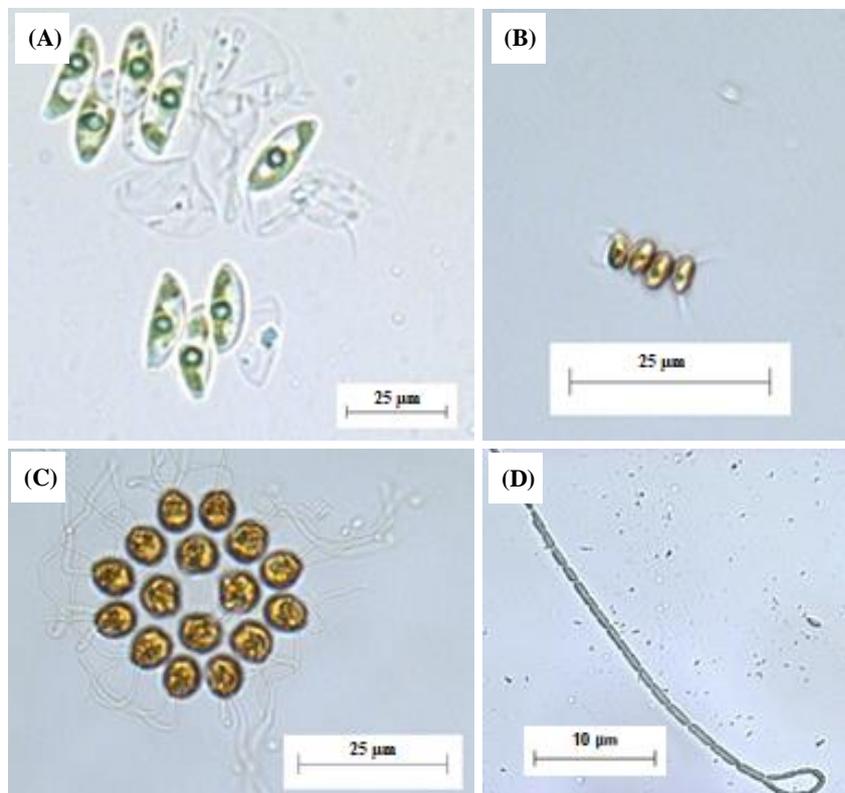
Figura 14 – Fotomicrografias das amostras da lagoa de águas continentais, destacando: (A) *Scenedesmus* sp.; (B) *Desmodesmus* sp.; e (C) *Chlorella* sp.



Fonte: próprio autor.

Nota: (A) e (B): aumento de 20x, escala de 25 µm; (C) aumento de 40x, escala de 10 µm.

Figura 15 – Fotomicrografias das amostras do espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor, destacando: (A) *Scenedesmus* sp., (B) *Desmodesmus* sp., (C) *Gonium pectorale*; e (D) *Pseudanabaena* sp.



Fonte: próprio autor.

Nota: (A), (B) e (C): aumento de 40x, escala de 25 µm; (D): aumento de 40x, escala de 10 µm.

Os gêneros *Desmodesmus* e *Scenedesmus* pertencem à família Scenedesmaceae, da ordem Chlorococcales, incluída na classe Chlorophyceae do filo Chlorophyta (BICUDO; MENEZES, 2006).

Chlorella sp. são espécies pertencentes à família Chlorellaceae, da ordem Chlorellales, incluídas na classe Trebouxiophyceae do filo Chlorophyta (KOMÁREK; FOTT, 1983).

Gonium pectorale é uma das espécies contidas na família de organismos biflagelados Volvocaceae, pertencente à ordem Chlamydomonadales⁷, incluída na classe Chlorophyceae do filo Chlorophyta (BICUDO; MENEZES, 2006; COLEMAN, 2012).

Pseudanabaena sp. são espécies da família Pseudanabaenaceae, da ordem Synechococcales, pertencente à classe Cyanophyceae do filo Cyanobacteria (KOMÁREK et al., 2014).

6.3 Ensaios de Aclimação

De modo geral, observou-se um aumento gradativo da densidade celular da comunidade fitoplanctônica entre o início e o final dos ensaios realizados tanto com as amostras provenientes da lagoa de águas continentais, quanto com as provenientes do espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor, variando de $5,1 \times 10^5$ células mL⁻¹ para $3,4 \times 10^7$ células mL⁻¹ e de $4,4 \times 10^5$ células mL⁻¹ para $1,5 \times 10^7$ células mL⁻¹, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15 – Densidade celular da comunidade fitoplanctônica nos ensaios de aclimação (n=4).

Fase de aclimação	RSBio/(RSBio+WC)	Densidade celular (células mL ⁻¹)	
		Lagoa de águas continentais	Espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor
Fase 1	1%	$5,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$
Fase 2	2%	$5,4 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$
Fase 3	5%	$1,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
Fase 4	10%	$2,3 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$
Fase 5	25%	$3,5 \times 10^6$	$6,9 \times 10^6$
Fase 6	35%	$4,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
Fase 7	50%	$3,3 \times 10^6$	$6,7 \times 10^6$
Fase 8	60%	$7,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$
Fase 9	80%	$2,6 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
Fase 10	100%	$3,4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$

Fonte: próprio autor.

⁷ De acordo com Encyclopedia of Life (2017) e National Center for Biotechnology Information (2017), Chlamydomonadales é o termo preferido entre seus sinônimos (Chlorococcales, Volvocales e Volvocida).

Entretanto, evidenciou-se que nem todos os microrganismos fitoplanctônicos identificados nas amostras ambientais e utilizados como inóculo dos ensaios de aclimação se desenvolveram positivamente em resposta ao aumento das concentrações de efluente suíno biodigerido. Portanto, com o decorrer das etapas de aclimação, foram notadas modificações na diversidade das microalgas e também na morfologia celular de algumas espécies.

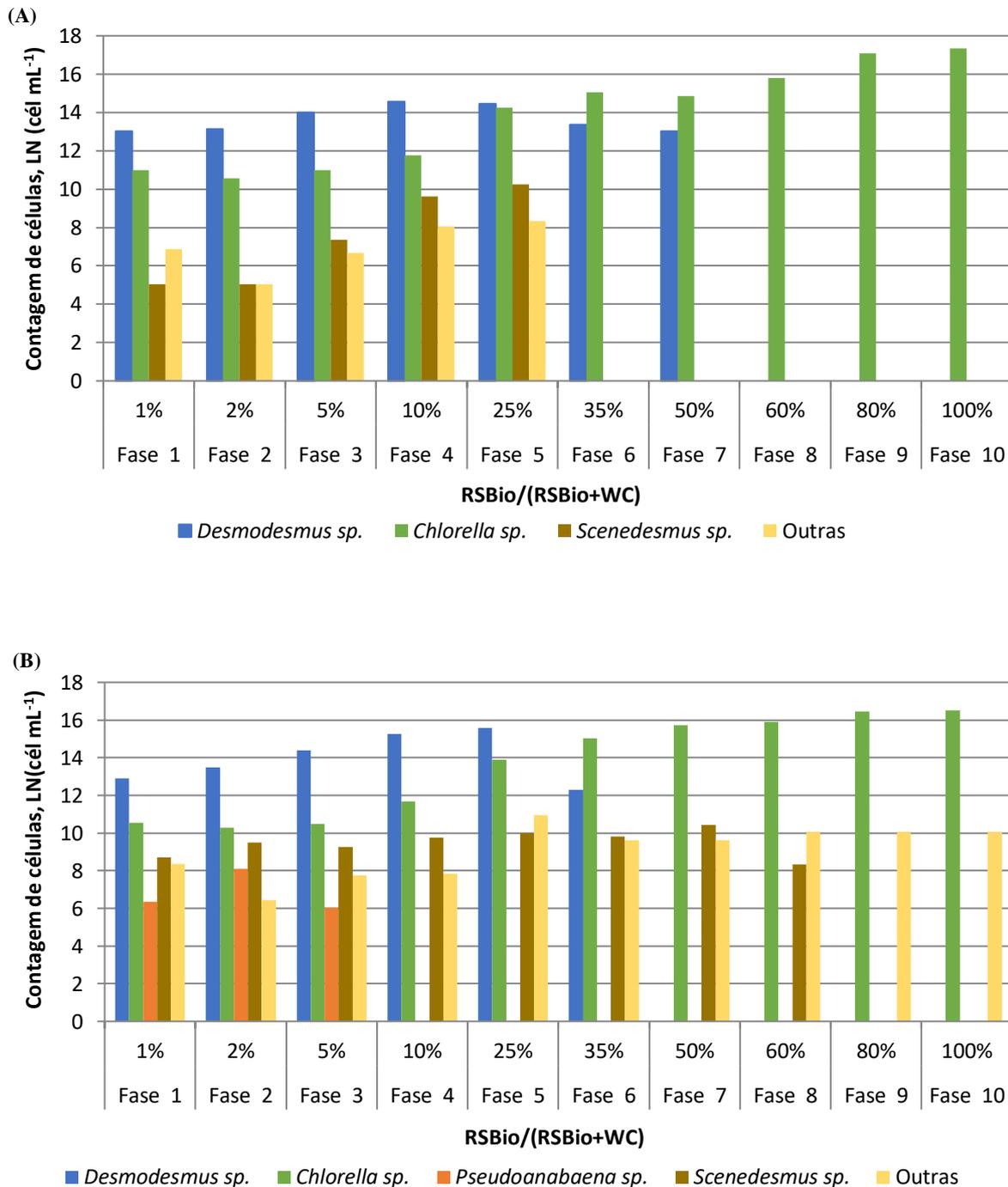
Em relação ao ensaio inoculado com a comunidade fitoplanctônica proveniente da lagoa de águas continentais, a densidade celular das espécies mais abundantes observadas desde a primeira fase de aclimação (*Desmodesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.) aumentou gradativamente até a quinta fase. Na sexta e na sétima fase, predominaram somente *Desmodesmus* sp. e *Chlorella* sp. A partir da oitava fase, notou-se a dominância de *Chlorella* sp. (Figura 16A).

Quanto ao ensaio inoculado com a comunidade fitoplanctônica presente no espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor, as espécies mais abundantes observadas desde a primeira fase de aclimação também foram *Desmodesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. e a densidade celular destas também aumentou gradativamente até a quinta fase. Na sexta fase, houve queda da densidade celular de *Desmodesmus* sp., sendo que, a partir da sétima fase, sua presença não foi mais notada. *Scenedesmus* sp. manteve seu crescimento até oitava fase de aclimação. A espécie que permaneceu em crescimento gradual após todas as etapas do ensaio foi *Chlorella* sp. (Figura 16B).

Tendo em vista os resultados supracitados, nota-se que determinadas concentrações de RSBio são capazes de provocar mudanças abruptas na comunidade fitoplanctônica. Esta observação permite indicar que o descarte de resíduo suíno de forma irregular ou acidental em corpos hídricos, ainda que esteja biodigerido, pode provocar sérios impactos ambientais.

No presente estudo, verificou-se que *Chlorella* sp. tem um elevado potencial adaptativo ao RSBio. Em uma análise preliminar da amostra de RSBio em microscópio invertido (Olympus®, BX 51), foi notada a presença desta espécie (densidade celular não estimada) mesmo sem que tivesse sido realizada qualquer inoculação de microrganismos fitoplanctônicos. Tal observação pode explicar o motivo de *Chlorella* sp. ter se desenvolvido melhor em relação às outras espécies inoculadas provenientes das amostras ambientais, a exemplo do que também foi percebido no estudo de García et al. (2018). Ou seja, muito provavelmente a estirpe que resistiu a todas as etapas do ensaio de aclimação é a mesma já presente no resíduo.

Figura 16 – Abundância relativa de microrganismos observados nos ensaios de aclimação realizados com amostras coletadas nos seguintes ambientes: (A) lagoa de águas continentais; e (B) espelho d'água formado sobre a lona do biodigestor (n=4).



Fonte: próprio autor.

A aclimação de microalgas provenientes de ambientes aquáticos naturais em concentrações progressivas de águas residuárias é importante para garantir a presença das vias metabólicas utilizadas como estratégias de adaptação (ELLIOTT et al., 2012). Por ser um

gênero versátil, *Chlorella* pode se desenvolver pelas vias fototrófica, heterotrófica ou mixotrófica (VAN WAGENEN; DE FRANCISCI; ANGELIDAKI, 2015) e possui propriedades robustas que garantem sua presença em ambientes eutrofizados, remediando-os e acumulando metabólitos de interesse comercial (CHENG et al., 2019).

6.4 Seleção e Isolamento das Estirpes de Microalgas

As três espécies mais abundantes nos ensaios de aclimação (*Desmodesmus* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.) foram isoladas e mantidas em laboratório conforme metodologia descrita no item 5.2.2.

Frente ao resultado observado nos ensaios de aclimação, *Chlorella* sp. foi selecionada para as próximas etapas da pesquisa. Procedeu-se, então, uma nova análise em microscópio óptico (Olympus®, BX 51) das amostras isoladas de *Chlorella* sp. para identificação desta cepa em nível de espécie. Com base em chave de identificação (KOMÁREK; FOTT, 1983), concluiu-se que trata-se de *Chlorella sorokiniana*.

6.5 Avaliação dos Efeitos dos Fatores Físicos no Crescimento das Microalgas

Na Tabela 16 estão descritas as respostas das variáveis $\mu_{máx}$ e A_C aos fatores temperatura e luminosidade delineados no experimento de otimização do cultivo de *C. sorokiniana* em RSBio.

Tabela 16 – Respostas das variáveis $\mu_{m\acute{a}x}$ e A_C aos fatores temperatura e luminosidade no DCCR.

Experimento	Tratamento	Temperatura (°C)	Luminosidade ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia^{-1})	A_C (u. a.)
1	T1	20,0	125,0	0,81	2,16
2	T1	20,0	125,0	0,81	2,29
3	T1	20,0	125,0	0,94	2,23
4	T2	22,9	36,6	1,07	2,57
5	T2	22,9	36,6	1,05	2,54
6	T2	22,9	36,6	1,18	2,55
7	T3	22,9	213,4	1,90	2,26
8	T3	22,9	213,4	1,97	2,29
9	T3	22,9	213,4	1,87	2,28
10	T4	30,0	0,0	3,02	0,95
11	T4	30,0	0,0	3,89	0,81
12	T4	30,0	0,0	3,23	0,76
13	T5	30,0	125,0	3,56	2,46
14	T5	30,0	125,0	3,15	2,50
15	T5	30,0	125,0	3,12	2,47
16	T5	30,0	125,0	3,42	2,49
17	T5	30,0	125,0	3,39	2,54
18	T5	30,0	125,0	3,54	2,50
19	T5	30,0	125,0	4,33	2,52
20	T5	30,0	125,0	4,30	2,49
21	T5	30,0	125,0	3,76	2,48
22	T5	30,0	125,0	4,46	2,53
23	T5	30,0	125,0	3,73	2,58
24	T5	30,0	125,0	4,08	2,57
25	T6	30,0	250,0	3,24	2,47
26	T6	30,0	250,0	3,28	2,44
27	T6	30,0	250,0	3,40	2,40
28	T7	37,1	36,6	3,06	1,70
29	T7	37,1	36,6	4,08	1,92
30	T7	37,1	36,6	3,80	1,88
31	T8	37,1	213,4	5,33	2,06
32	T8	37,1	213,4	4,76	2,08
33	T8	37,1	213,4	5,28	1,97
34	T9	40,0	125,0	-	0,65
35	T9	40,0	125,0	-	0,53
36	T9	40,0	125,0	-	0,55

Fonte: próprio autor.

No tratamento em que foi abordada a temperatura de 40 °C (T9), as células de microalgas não resistiram já no primeiro dia, impossibilitando o ajuste dos resultados deste tratamento ao modelo de Gompertz e, conseqüentemente a obtenção dos valores de $\mu_{m\acute{a}x}$.

Sendo assim, não foi possível incluir os experimentos do tratamento T9 na modelagem preditiva para $\mu_{m\acute{a}x}$.

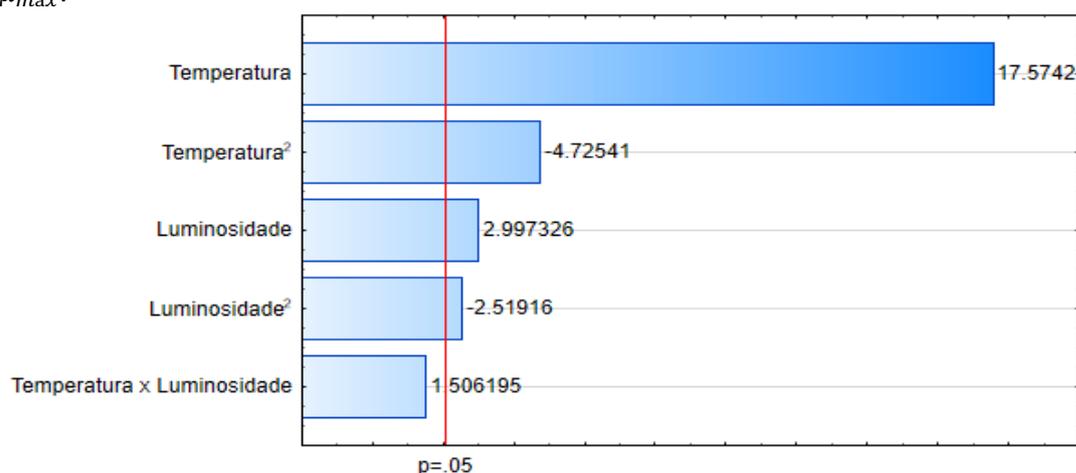
De acordo com a ANOVA do DCCR para a variável $\mu_{m\acute{a}x}$ (Tabela 17) e conforme o esquema representativo da significância dos coeficientes pelo diagrama de Pareto (Figura 17), o coeficiente “temperatura x luminosidade” não foi significativo ($p > 0,05$) para o ajuste das curvas de resposta e, portanto, foi excluído do modelo.

Tabela 17 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a variável $\mu_{m\acute{a}x}$.

Fonte de variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F	p valor
<i>Regressão</i>	47,4923	5	9,4985	44,1788	$3,64 \times 10^{-12}$
Temperatura	43,6242	1	43,6242	308,8527	$1,39 \times 10^{-15}$
Temperatura ²	3,15396	1	3,15396	22,3295	$7,59 \times 10^{-05}$
Luminosidade	1,78488	1	1,78488	12,6367	$1,54 \times 10^{-03}$
Luminosidade ²	0,89637	1	0,89637	6,34615	$1,85 \times 10^{-02}$
Temperatura x Luminosidade					<i>parâmetro excluído do modelo ($p > 0,05$)</i>
Resíduo	6,12545	28	0,21877		
Falta de ajuste	2,59430	3	0,86477	6,1224	$2,87 \times 10^{-3}$
Erro puro	3,53115	25	0,14125		
Total	53,29729	32			
R ²	0,88507				
R ² ajustado	0,86865				

Fonte: próprio autor.

Figura 17 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo obtidos do DCCR para a variável $\mu_{m\acute{a}x}$.

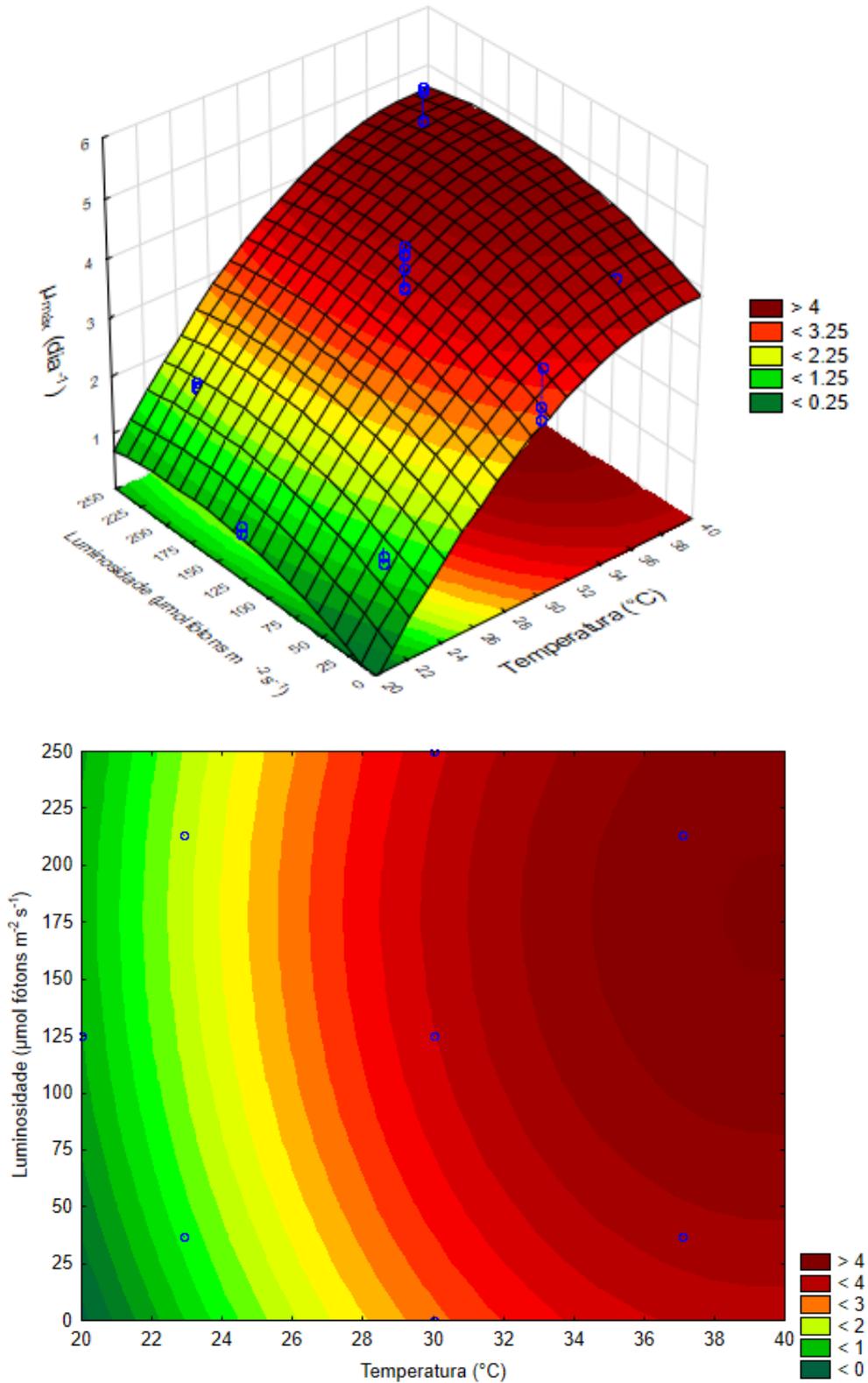


Fonte: próprio autor.

Nota: Barras horizontais à direita do limite de significância ($p < 0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

As superfícies de resposta geradas pelo modelo para prever $\mu_{m\acute{a}x}$ da cepa *C. sorokiniana* em função da temperatura e luminosidade estão apresentadas na (Figura 18).

Figura 18 – Superfícies de resposta geradas pelo modelo preditivo de $\mu_{m\acute{a}x}$ para a cepa *Chlorella sorokiniana* cultivada em RSBio em função da temperatura e da luminosidade.



Fonte: próprio autor.

Nota: Pontos azuis representam os pontos experimentais delineados no experimento de otimização do cultivo de *Chlorella sorokiniana* em RSBio, para a geração do modelo preditivo.

Mesmo com a impossibilidade de incluir na modelagem o tratamento T9 (40 °C / 125 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o modelo preditivo de $\mu_{\text{máx}}$ (Equação 6) apontou regiões ótimas acima da faixa experimental de temperatura, indicando valores de $\mu_{\text{máx}}$ acima de 4 dia^{-1} para temperaturas superiores a 40 °C em intensidades luminosas variando entre 160 e 210 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

$$\mu_{\text{máx}} = -12,19757 + 0,80961*\text{temperatura} - 0,01021*\text{temperatura}^2 + 0,01023*\text{luminosidade} - 0,00003*\text{luminosidade}^2 \quad (6)$$

De acordo com estudo de Kessler (1985), que investigou os limites superiores de temperatura para 13 espécies de *Chlorella*, foi constatado que somente *C. sorokiniana* possui característica termofílica, com tolerância máxima de temperatura na faixa de 38 a 42 °C. Segundo o autor, o limite de tolerância é específico para cada espécie do gênero. Portanto, esta informação corrobora a identificação microscópica da cepa realizada na etapa de seleção e isolamento desta pesquisa.

Tendo em vista a necessidade de ajuste do modelo preditivo, a estratégia para deslocar o ponto ótimo de $\mu_{\text{máx}}$ para níveis centrais seria realizar experimentos em temperaturas mais elevadas. Entretanto, como já mencionado, a temperatura de 40 °C foi limitante para o cultivo de *C. sorokiniana* em RSBio, o que, neste caso, tornou esta estratégia refutável.

Baseando-se na superfície do modelo e nos valores experimentais de $\mu_{\text{máx}}$ (Tabela 16) observou-se que na temperatura de 37,1 °C, houve um gradiente de $\mu_{\text{máx}}$ em função do aumento da intensidade luminosa (36,6 a 213,4 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No estudo de Santos (2013), também se verificou maiores otimizações de $\mu_{\text{máx}}$ de duas cepas de *Chlorella* spp. em temperaturas entre 37 e 41 °C e intensidades luminosas entre 170 a 220 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A condição de 37,1 °C e 179 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi, portanto, escolhida para a execução da validação. Nesta condição, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ previsto pelo modelo foi de 4,81 dia^{-1} e o valor encontrado experimentalmente para validá-lo (n=5) foi de $3,63 \pm 0,46 \text{ dia}^{-1}$. Houve variação de 24,5% entre o valor previsto e o real, indicando que o modelo preditivo de $\mu_{\text{máx}}$ poderia ser melhorado, caso seu valor de R^2 ajustado (Tabela 17) de 0,86865 fosse maior.

Nos estudos de Franco et al. (2012), foi observado que, na temperatura ótima de crescimento para *C. sorokiniana* (38 °C), a taxa de crescimento específica foi de 4,32 dia^{-1} .

Para a variável A_C , de acordo com a ANOVA do DCCR (Tabela 18) e conforme o esquema representativo da significância dos coeficientes pelo diagrama de Pareto (Figura 19),

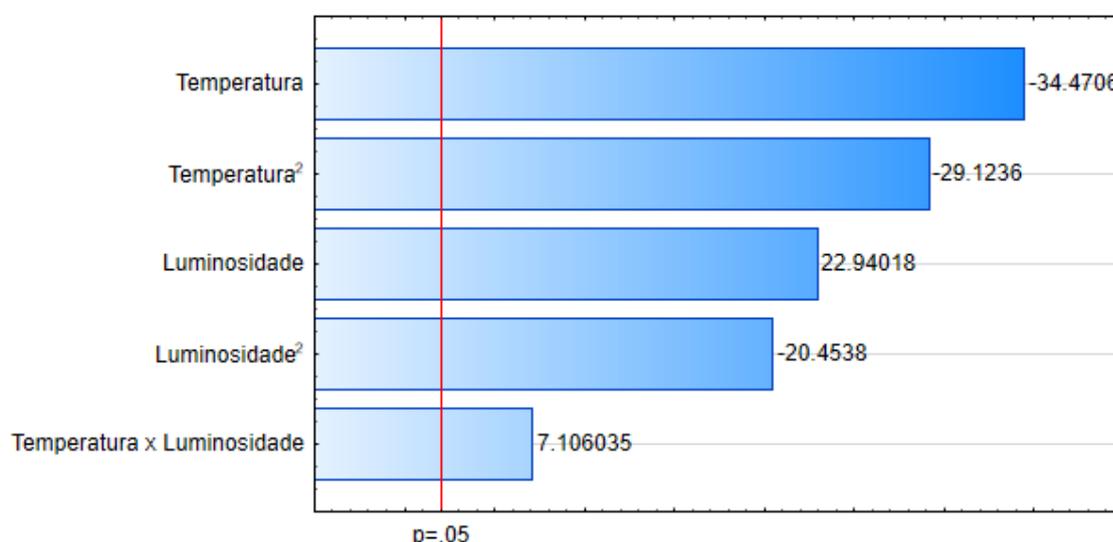
todos os termos do modelo quadrático (temperatura, temperatura², luminosidade, luminosidade², temperatura x luminosidade) foram significativos ($p < 0,05$) e incluídos na modelagem.

Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR para a variável A_C .

Fonte de variação	S.Q.	G.L.	Q.M.	F	p valor
Regressão	9,65682	5	1,93137	10,645	$5,98 \times 10^{-06}$
Temperatura	4,04358	1	4,04358	1188,224	$7,37 \times 10^{-24}$
Temperatura ²	2,88641	1	2,88641	848,186	$6,22 \times 10^{-22}$
Luminosidade	1,79086	1	1,79086	526,252	$3,06 \times 10^{-19}$
Luminosidade ²	1,42369	1	1,42369	418,359	$5,76 \times 10^{-18}$
Temperatura x Luminosidade	0,17184	1	0,17184	50,496	$1,22 \times 10^{-07}$
Resíduo	5,44279	30	0,181426		
Falta de ajuste	5,35091	3	1,7883637	524,130	$4,97 \times 10^{-24}$
Erro puro	0,09188	27	0,003403		
Total	15,09962	35			
R ²	0,63954				
R ² ajustado	0,57946				

Fonte: próprio autor.

Figura 19 – Diagrama de Pareto dos coeficientes do modelo preditivo obtidos do DCCR para a variável A_C .

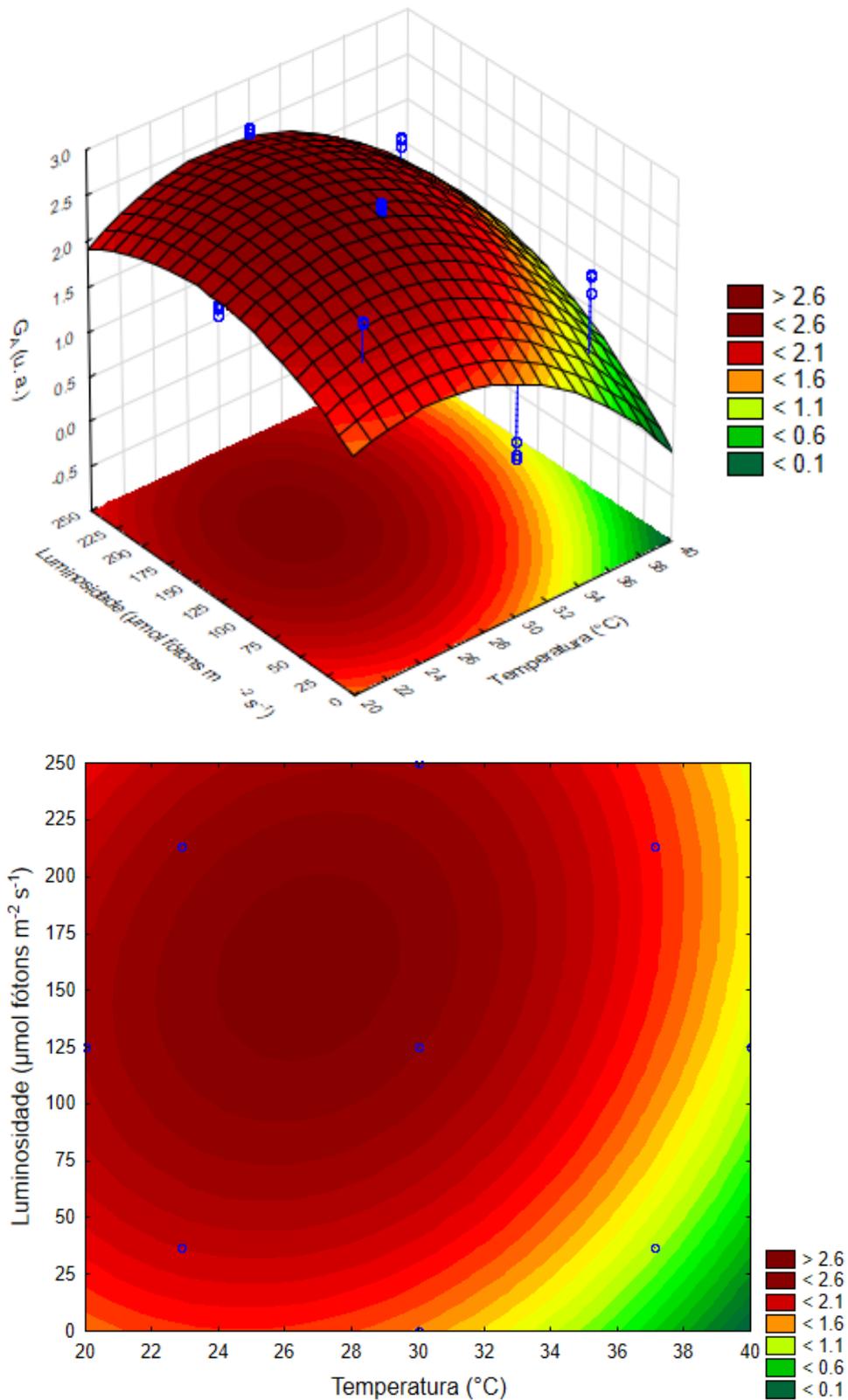


Fonte: próprio autor.

Nota: Barras horizontais à direita do limite de significância ($p < 0,05$) representam os coeficientes que foram estatisticamente significativos para o modelo.

As superfícies de resposta geradas pelo modelo para prever A_C da cepa *C. sorokiniana* em função da temperatura e luminosidade estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20 – Superfícies de resposta geradas pelo modelo preditivo de A_C para a cepa *Chlorella sorokiniana* cultivada em RSBio em função da temperatura e da luminosidade.



Fonte: próprio autor.

Nota: Pontos azuis representam os pontos experimentais delineados no experimento de otimização do cultivo de *Chlorella sorokiniana* em RSBio, para a geração do modelo preditivo.

O modelo preditivo de A_C (Equação 7) aponta para valores maiores do que 2,6 (u. a.) em níveis de temperatura de 24 a 29 °C e intensidades luminosas entre 125 e 200 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

$$A_C = -2,93392 + 0,38255*\text{temperatura} - 0,007739*\text{temperatura}^2 + 0,00608*\text{luminosidade} - 0,00003*\text{luminosidade}^2 + 0,00019*\text{temperatura}*\text{luminosidade} \quad (7)$$

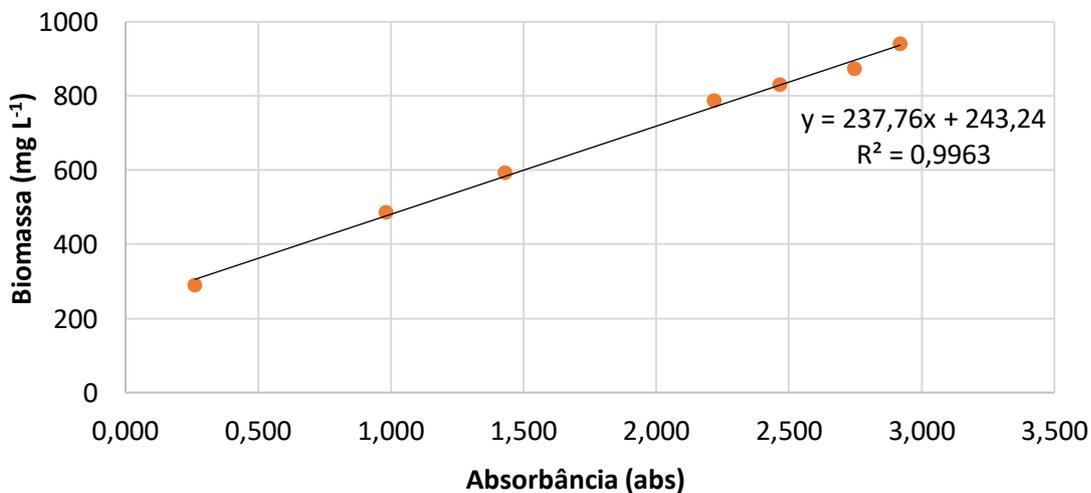
Na condição escolhida para a validação, 26 °C e 160 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o valor de A_C previsto pelo modelo foi de 2,66 (u. a.) e o valor encontrado experimentalmente para validá-lo (n=5) foi de $2,50 \pm 0,03$ (u. a.). Houve variação de 6,4% entre o valor previsto e o real, indicando que o modelo preditivo de A_C está calibrado para o ponto testado, embora de acordo com a ANOVA (Tabela 18), o R^2 ajustado para este modelo tenha sido de 0,57946.

6.6 Avaliação da Remoção de Nutrientes e da Produção de Biomassa e Metabólitos

O ensaio de remoção de nutrientes e da produção de biomassa e metabólitos foi baseado na melhor condição observada em relação à variável resposta A_C . Portanto, foi adotada como condição otimizada a temperatura a 26 °C e luminosidade de 160 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo claro/escuro ajustado para 12h/12h.

Na Figura 21 está apresentada a regressão linear entre absorvância e biomassa, utilizada para a avaliação do crescimento de *C. sorokiniana* em RSBio.

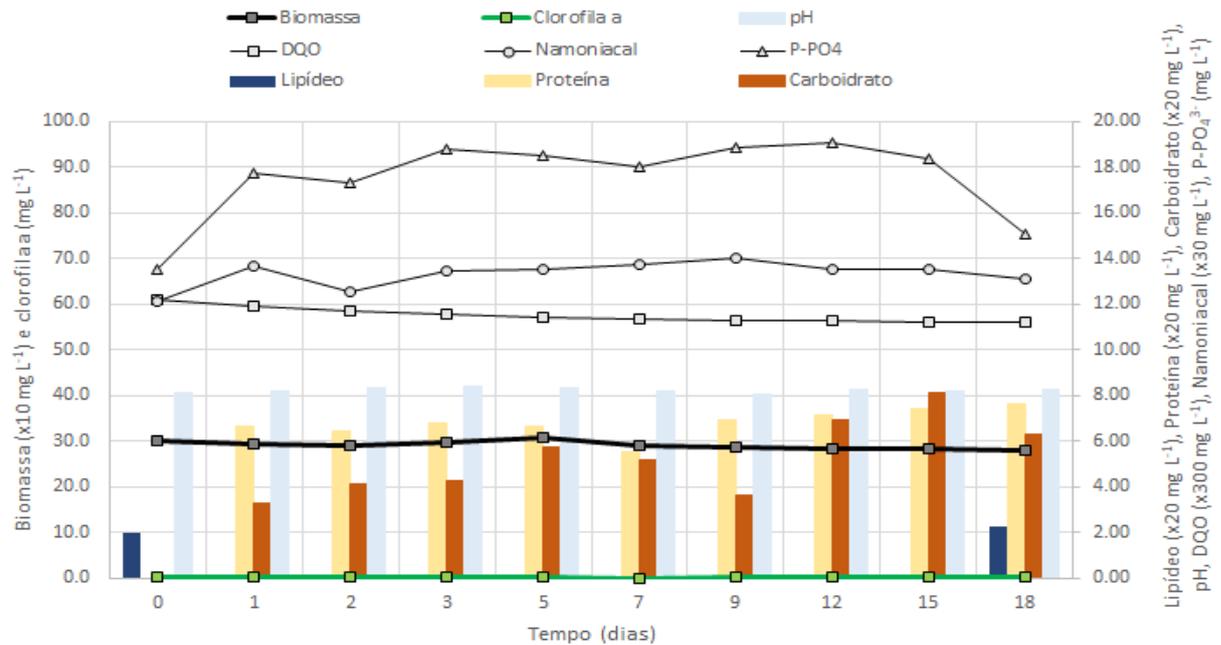
Figura 21 – Regressão entre sólidos suspensos totais e absorvância ($\lambda = 683 \text{ nm}$) para o cultivo de *Chlorella sorokiniana* em RSBio.



Fonte: próprio autor.

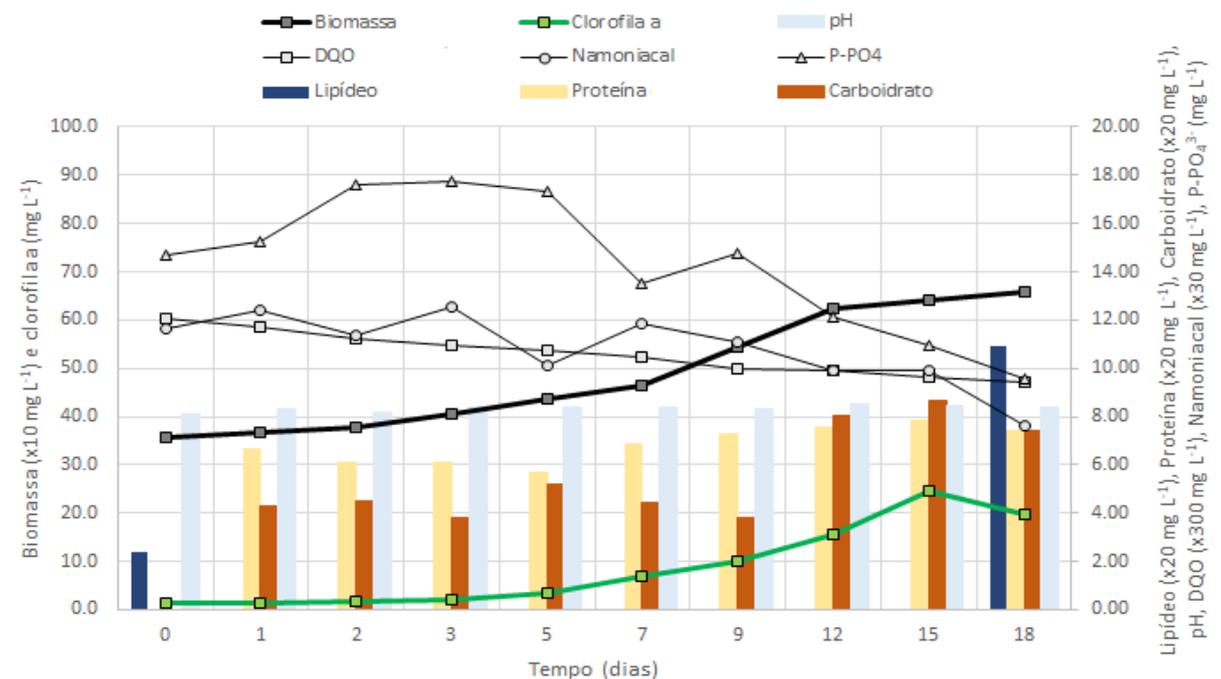
O comportamento das variáveis monitoradas nos tratamentos RSBio0, RSBio10, RSBio40 e RSBio60 está representado nas Figura 22, Figura 23, Figura 24 e Figura 25, respectivamente, e discutido nos subitens a seguir.

Figura 22 – Monitoramento do tratamento RSBio0 (sem inóculo de *Chlorella sorokiniana*) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.



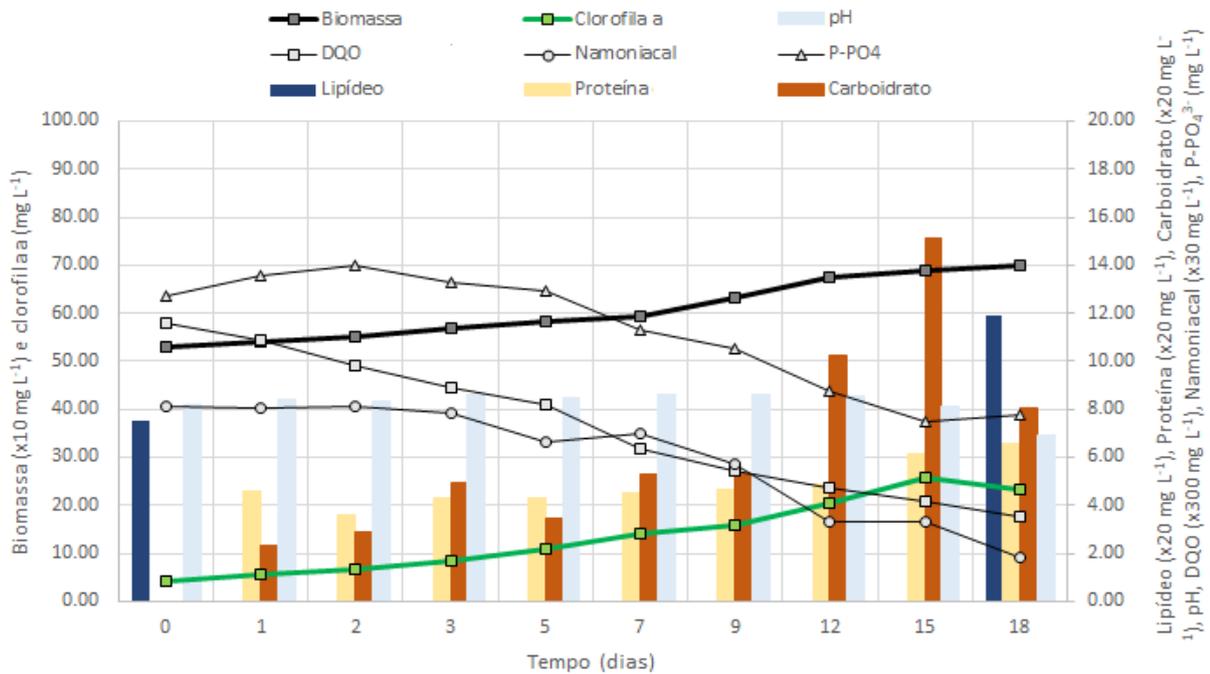
Fonte: próprio autor.

Figura 23 – Monitoramento do tratamento RSBio10 (inóculo inicial de *Chlorella sorokiniana* de 1×10^6 células mL⁻¹) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.



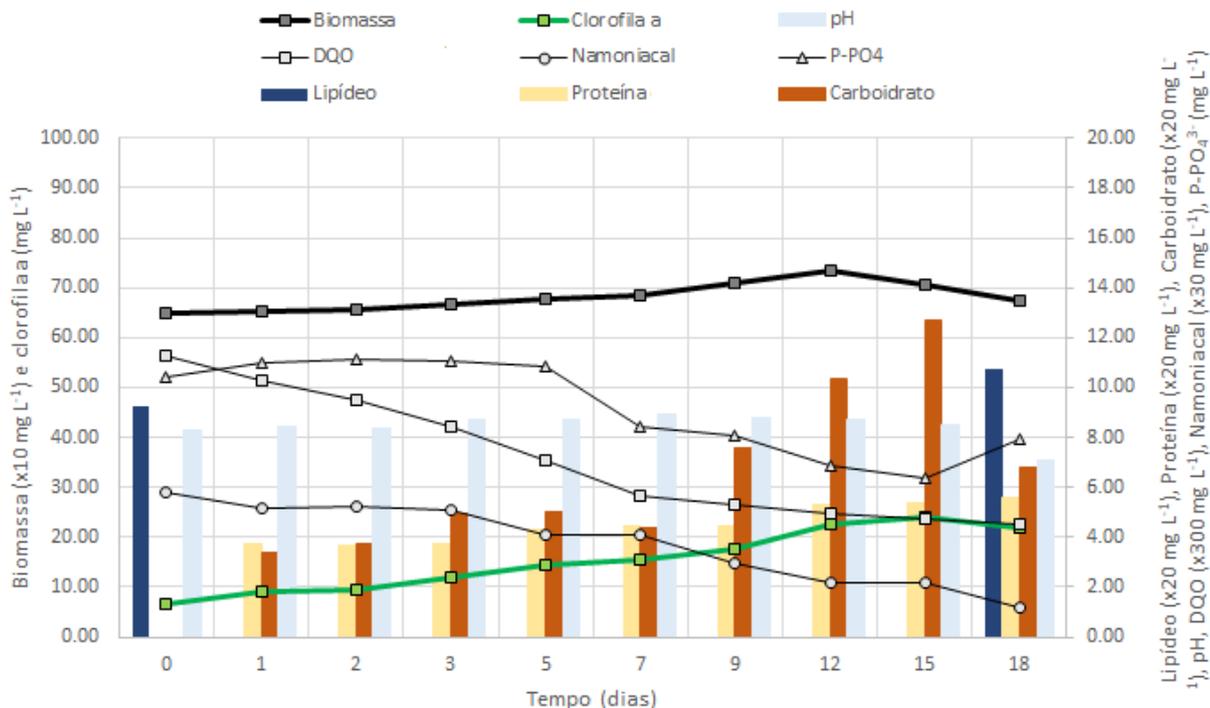
Fonte: próprio autor.

Figura 24 – Monitoramento do tratamento RSBio40 (inóculo inicial de *Chlorella sorokiniana* de 4×10^6 células mL^{-1}) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.



Fonte: próprio autor.

Figura 25 – Monitoramento do tratamento RSBio60 (inóculo inicial de *Chlorella sorokiniana* de 6×10^6 células mL^{-1}) no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos.



Fonte: próprio autor.

A Tabela 19 apresenta a compilação dos principais parâmetros de crescimento, o perfil bioquímico da biomassa produzida, suas produções e produtividades e remoção de nutrientes.

Tabela 19 – Compilação dos principais parâmetros de crescimento, perfil bioquímico da biomassa, suas produções e produtividades e remoção de nutrientes.

Parâmetros	RSBio0		RSBio10		RSBio40		RSBio60					
Perfil bioquímico *												
Biomassa (mg L ⁻¹)	280,8		658,6		700,9		675,5					
Clorofila <i>a</i> (mg L ⁻¹) (%)	0,10	0,0	24,7	3,9	25,6	3,7	23,9	3,4				
Lipídeos (mg L ⁻¹) (%)	44,90	16,0	217,8	33,1	238,5	34,0	214,3	31,7				
Proteínas (mg L ⁻¹) (%)	152,1	54,2	148,6	22,6	130,8	18,7	111,4	16,5				
Carboidratos (mg L ⁻¹) (%)	162,54	44,6	172,7	27,0	302,0	43,9	254,1	36,1				
Produções (incrementos) e produtividades *												
Biomassa (mg L ⁻¹) (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) (%)	0,0	0,0	0,0	300,3	16,7	83,8	172,9	9,6	32,7	27,3	3,1	4,2
Clorofila <i>a</i> (mg L ⁻¹) (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) (%)	0,0	0,0	0,0	23,5	1,6	1.869,0	21,6	1,4	547,8	17,4	1,2	270,6
Lipídeos (mg L ⁻¹) (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) (%)	5,7	0,3	14,5	170,6	9,5	361,4	87,6	4,9	58,1	30,0	1,7	16,3
Proteínas (mg L ⁻¹) (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) (%)	20,0	1,1	15,6	16,3	0,9	12,5	39,5	2,2	43,7	36,5	2,0	48,9
Carboidratos (mg L ⁻¹) (mg L ⁻¹ dia ⁻¹) (%)	97,0	6,5	148,0	86,5	5,8	100,4	254,9	17,0	564,4	186,4	12,4	275,6
Remoções no substrato												
Remoção de DQO (mg L ⁻¹) (%)	292,00	8,0	794,9	22,0	2.404,8	69,3	2.027,9	60,0				
Remoção de N-amoniaco (mg L ⁻¹) (%)	-	-	120,5	34,5	188,8	77,6	139,1	80,0				
Remoção de PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹) (%)	-	-	5,1	34,8	5,0	39,0	2,5	23,9				
Relação N:P assimilado (M)	-	-	52:1	-	84:1	-	124:1	-				

Fonte: próprio autor.

Nota: *calculado no dia em que se alcançou o valor máximo de produção de cada constituinte (15° dia para clorofila *a* e carboidratos e 18° dia para biomassa, lipídeos e proteínas).

6.6.1 Modelo de Gompertz

Não foi possível ajustar o modelo de Gompertz para todos os tratamentos, pois em RSBio0 não havia inóculo de microalgas, logo não se obteve uma curva de crescimento, além de que em RSBio60 não houve crescimento fitoplancctônico expressivo entre o início e o final do ensaio.

A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) em RSBio10 (0,41 dia⁻¹) e RSBio40 (0,12 dia⁻¹) foi 6,9 e 23,5 vezes inferior à observada no ensaio de avaliação dos fatores físicos no crescimento das microalgas (2,82 dia⁻¹) considerando as mesmas condições de cultivo (26 °C e 160 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). No mesmo sentido, para estes dois tratamentos a amplitude de crescimento (A_C) foi respectivamente 2,1 e 5,6 vezes inferior à obtida no ensaio de otimização (2,66 u.a.).

Vale ressaltar que, embora em ambos os ensaios as culturas foram inoculadas quando se encontravam em fase exponencial de crescimento, no ensaio de avaliação dos fatores físicos inoculou-se $1,3 \times 10^7$ células mL⁻¹ e no ensaio de recuperação de nutrientes, os tratamentos RSBio10 e RSBio40 iniciaram com $1,0 \times 10^6$ e $4,0 \times 10^6$ células mL⁻¹, respectivamente.

Deste modo, há indícios de que, independentemente de a cultura ter sido inoculada em fase exponencial de crescimento, houve efeito da densidade celular inicial nos parâmetros de crescimento, possivelmente porque em menores concentrações de inóculo podem ter ocorrido relações desarmônicas interespecíficas (competição, predatismo ou amensalismo) que tenham prejudicado o desenvolvimento das microalgas, haja vista que seu cultivo em resíduo suíno biodigerido não foi conduzido para que ocorresse de forma axênica.

Hu et al. (2012) observou que, após cultivo por 5 dias em escala laboratorial, *Chlorella* sp. alcançou taxa de crescimento de 0,90 dia⁻¹ no efluente diluído de água residuária de suínos previamente enriquecido com ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação acidogênica.

6.6.2 Manutenção, Produções e Produtividades

6.6.2.1 Biomassa

No tratamento em que *C. sorokiniana* não foi inoculada (RSBio0), não houve variação expressiva da biomassa ao longo do período avaliado, mantendo um valor médio de

290,6 ± 8,8 mg L⁻¹. O maior incremento de biomassa (83,8%, p<0,05) ocorreu em RSBio10, representando um aumento absoluto de 300,3 mg L⁻¹ em relação ao dia 0, superior aos 32,7% (172,9 mg L⁻¹) e aos 4,2% (27,3 mg L⁻¹) dos incrementos observados nos tratamentos RSBio40 e RSBio60, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre os valores de biomassa observados ao final do período avaliado nos tratamentos RSBio10, RSBio40 e RSBio60 (p>0,05). Com exceção do tratamento RSBio0, os cultivos chegaram em fase estacionária no 12º dia, com um leve declínio somente em RSBio60, a partir desta data.

Em estudo de cultivo de *C. vulgaris* em águas residuárias de suínos, Nam et al. (2017) observaram que, quando o resíduo foi diluído 8 vezes (concentrações iniciais de 1.481,3, 298,2 e 4,2 mg L⁻¹ para DQO_{solúvel}, N-NH₄⁺ e P-Total, respectivamente), a produtividade de biomassa foi de 247,0 mg L⁻¹ dia⁻¹, ou seja, 14,8 vezes superior à alcançada em RSBio10 (concentrações iniciais de 3.616,0, 349,6 e 14,7 mg L⁻¹ para DQO, N-amoniacoal e P-PO₄³⁻, respectivamente).

Amini et al. (2016) verificaram que o crescimento de *C. vulgaris* em resíduo suíno (concentrações iniciais de 102 e 76 mg L⁻¹ dia⁻¹ de N-Total e P-Total, respectivamente) foi na proporção de 160 mg L⁻¹ dia⁻¹, 9,6 vezes superior à alcançada em RSBio10.

Leite et al. (2019) realizaram o crescimento de *C. sorokiniana* em uma mistura de esgoto sanitário com resíduo de suinocultura na proporção de 3:1 previamente tratada em Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente (concentração inicial média de DQO de 6.992,0 mg L⁻¹). Após 7 dias, a produtividade média de biomassa foi de 142,86 mg L⁻¹ dia⁻¹, 8,6 vezes superior à máxima alcançada nesta pesquisa (16,7 mg L⁻¹ dia⁻¹) no tratamento RSBio10.

Nos experimentos de Dinnebier et al. (2021), verificou-se que o cultivo de *C. sorokiniana* em resíduo suíno digerido com concentrações iniciais de 1.000,0 mg L⁻¹ de N-amoniacoal e pH neutro (7,0 a 7,5) alcançou sua produtividade máxima de biomassa (198,0 mg L⁻¹ dia⁻¹), aproximadamente 12 vezes superior à obtida nesta pesquisa, no tratamento RSBio10, cuja concentração inicial de N-amoniacoal foi quase 3 vezes menor e o pH entre 8,0 e 8,5.

Nos estudos de Wang et al. (2015), a utilização de água residuária de suínos diluída 5 vezes (concentrações iniciais de 3.665, 264,8 e 174 mg L⁻¹ para DQO, N-NH₃ e P-PO₄³⁻, respectivamente) para o crescimento de *C. vulgaris*, resultou no incremento médio de biomassa de 451,4 mg L⁻¹ dia⁻¹, 27 vezes a mais que o obtido neste trabalho, em RSBio10.

Cultivando um consórcio de microalgas com dominância do gênero *Chlorella*, Ayre Moheimani e Borowitzka. (2017) reportaram que, ao dobrar a concentração de amônia de 800 para 1.600 mg L⁻¹, notou-se redução de 21% de produtividade de biomassa ao final do mesmo

período avaliado (37 dias). Entretanto, na cultura cultivada a 1.600 mg L^{-1} e com adição de CO_2 para manter o pH em valor de 8,0, foi observado aumento de 17% na produtividade de biomassa.

6.6.2.2 *Clorofila a*

Como esperado, em RSBio0 não houve produção de clorofila *a*, devido à ausência de microrganismos fototróficos na mistura reacional. Nos demais tratamentos, a relação clorofila *a*/biomassa teve aumento gradativo, partindo de valores entre 0,0 e 1,0% no dia 0 e alcançando valores entre 3,4 e 3,9% no dia 15. O maior incremento clorofila *a* entre os dias 0 e 15 (1.869,0%; $p < 0,05$) ocorreu em RSBio10, representando um acréscimo absoluto de $23,5 \text{ mg L}^{-1}$, superior aos acréscimos de 547,8% ($21,6 \text{ mg L}^{-1}$) e de 270,6% ($17,4 \text{ mg L}^{-1}$) observados neste mesmo período nos tratamentos RSBio40 e RSBio60, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre os teores de clorofila *a* observados ao final de 15 dias nos tratamentos RSBio10, RSBio40 e RSBio60 ($p > 0,05$). A partir do 15º dia, observou-se declínio na concentração de clorofila *a* em todos os tratamentos, possível indício de sua degradação.

Deng et al. (2017) observaram que o conteúdo de pigmentos em *C. vulgaris* atingiu valores máximos de 3,4% e 2,5% quando cultivada em resíduo suíno digerido diluído 3 vezes, autoclavado (concentrações iniciais de 6.567, 134 e 39 mg L^{-1} para DQO, N-Total e P-Total) e não autoclavado (concentrações iniciais de 6.200, 154 e 38 mg L^{-1} para DQO, N-Total e P-Total), respectivamente. Estes dados condizem com os relatos de Nam et al. (2017), que verificaram maiores acúmulos de clorofila nas células de *C. vulgaris* cultivadas em resíduo suíno diluído 6, 8 e 10 vezes, sendo que a maior concentração final de clorofila *a* foi de $184,2 \text{ mg L}^{-1}$ em resíduo diluído 8 vezes (concentrações iniciais de 1.481, 307 e 4,2 mg L^{-1} para DQO_{solúvel}, N-Total e P-Total, respectivamente), ou seja, teor de clorofila *a* superior em 7,5 e 7,7 vezes aos obtidos neste presente trabalho em RSBio10 e RSBio40, respectivamente.

6.6.2.3 *Lipídeo*

Não houve variação expressiva na concentração de lipídeos em RSBio0 entre os dias 0 ($39,2 \text{ mg L}^{-1}$) e 18 ($44,9 \text{ mg L}^{-1}$). O maior incremento de lipídeos (361,4%; $p < 0,05$) ocorreu em RSBio10, representando um aumento absoluto de $170,6 \text{ mg L}^{-1}$ em relação ao dia 0. Incrementos de 58,1% ($87,6 \text{ mg L}^{-1}$), 16,3% (30 mg L^{-1}) e 14,5% ($5,7 \text{ mg L}^{-1}$) foram

observados nos tratamentos RSBio40, RSBio60 e RSBio0, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de lipídeos observadas ao final do período avaliado nos tratamentos RSBio10, RSBio40 e RSBio60 ($p > 0,05$), correspondentes entre 31,7 e 34,0% da biomassa.

Ganeshkumar et al. (2018) cultivaram *Chlorella* sp. em misturas de águas residuárias de suínos com as de vinícolas e encontraram que, na proporção de 20:80 (suíno:vinícola), foi alcançado o maior teor de lipídeos (51% em relação à biomassa seca).

Quando *C. vulgaris* foi cultivada por Nam et al. (2017) em resíduo suíno diluído 8 vezes (concentrações iniciais de 1.481, 307 e 4,2 mg L⁻¹ para DQO_{solúvel}, N-Total e P-Total, respectivamente), a produtividade lipídica foi de 67 ± 6 mg L⁻¹ dia⁻¹ (7 vezes superior à alcançada neste trabalho, em RSBio10).

Chlorella sp. foi cultivada por Hu et al. (2012) em água residuária de suínos enriquecida com ácidos orgânicos oriundos de uma fermentação acidogênica realizada previamente (concentrações iniciais de DQO entre 1.300 e 2.000 mg L⁻¹, de N-Total entre 100 e 110 mg L⁻¹ e de P-PO₄³⁻ entre 28 e 35 mg L⁻¹). Após 7 dias de cultivo em batelada em escala laboratorial, foi obtida uma biomassa de microalgas composta por cerca de 30% de lipídeos em todos os tratamentos realizados.

Gatti et al. (2006) observaram produtividades lipídicas de 18,3 e 20,0 mg L⁻¹ dia⁻¹ para *C. minutíssima* cultivada em misturas de água autoclavada com resíduo suíno biodigerido filtrado e autoclavado, cujas concentrações iniciais de nitrogênio eram de 23,0 e 34,5 mg L⁻¹, respectivamente. Ou seja, tais autores obtiverem valores acima do dobro do alcançado na melhor condição experimentada nesta pesquisa para o parâmetro em questão.

No trabalho de Zhu et al. (2013), o cultivo de *C. zofingiensis* em água residuária de suíno diluída (concentração inicial de DQO de 1.900 mg L⁻¹) apresentou produtividade lipídica de 110,56 mg L⁻¹ dia⁻¹, o que representou um conteúdo de lipídeos e 37,5% em relação à biomassa seca.

Outros autores que desenvolveram cultivo de *Chlorella* spp. em resíduo suíno alcançaram produção de biomassa com teor lipídico variando entre 27,0 e 45,8 %, com produtividades de lipídeos de 7,2 a 100 mg L⁻¹ dia⁻¹ (HU et al., 2012; WANG et al., 2012; ABOU-SHANAB et al., 2013; JI et al., 2013; ZHU et al., 2013; YUAN et al., 2013; MARJAKANGAS et al., 2015).

6.6.2.4 Proteína

Os maiores incrementos de proteínas (48,9 e 43,7%; $p < 0,05$) ocorreram respectivamente nos tratamentos RSBio60 e RSBio40 e correspondem aos aumentos absolutos de 36,5 e 39,5 mg L⁻¹ em relação ao dia 1. Incrementos de 15,6% (20,0 mg L⁻¹) e de 12,5% (16,3 mg L⁻¹) foram notados nos tratamentos RSBio0 e RSBio10, respectivamente. Ao final do período avaliado, as maiores concentrações de proteínas foram observadas nos tratamentos RSBio0 e RSBio10 (152,1 e 148,6 mg L⁻¹; $p < 0,05$), superior à dos tratamentos RSBio40 (130,8 mg L⁻¹) e RSBio60 (111,4 mg L⁻¹).

Nos ensaios de Dinnebier et al. (2021), após 10 dias, o crescimento da biomassa de *C. sorokiniana* no resíduo suíno biodigerido apresentou alto teor de proteínas (59,5%) devido à elevada concentração inicial de nitrogênio amoniacal (1.300 mg L⁻¹). Michelon et al. (2015) também cultivaram *Chlorella* sp. em resíduo suíno digerido contendo inicialmente $750,4 \pm 49,7$ mg N-NH₃ L⁻¹ e, ao final de 25 dias de ensaio, observaram fração de 58,9% de proteínas na biomassa de microalgas.

6.6.2.5 Carboidrato

Em relação aos carboidratos, o maior incremento (564,4%; $p < 0,05$) entre os dias 1 e 15 ocorreu no tratamento RSBio40 e corresponde a um aumento absoluto de 254,9 mg L⁻¹ em relação ao dia 1, ou seja, uma média de 17,0 mg L⁻¹ dia⁻¹. Incrementos de 275,6% (186,4 mg L⁻¹), 148,0% (97,0 mg L⁻¹) e 100,4% (86,5 mg L⁻¹) foram observados nos tratamentos RSBio60, RSBio0 e RSBio10, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de carboidratos observadas no 15º dia nos tratamentos RSBio10, RSBio40 e RSBio60 ($p > 0,05$). A partir desta data, observou-se declínio na concentração de carboidratos em todos os tratamentos.

Em cultivo de *C. vulgaris* em resíduo suíno digerido diluído (concentração inicial de 233 mg N-NH₄⁺ L⁻¹), Marjakangas et al. (2015) verificaram que, após 16 dias, o acréscimo de carboidratos na fase líquida foi de 150 mg L⁻¹ (média de 9,4 mg L⁻¹ dia⁻¹), enquanto que Wang et al. (2015) observaram produtividade de carboidrato de 182 mg L⁻¹ dia⁻¹, obtendo teor de 58,3% de carboidratos após 5 dias de cultivo de *C. vulgaris* neste mesmo tipo de resíduo com concentração inicial de 264,8 mg N-NH₃ L⁻¹.

6.6.2.6 pH

Em todos os tratamentos, não houve variações marcantes no pH até o dia 15, os quais mantiveram valores entre 8,1 e 8,9. No dia 18, foi observada uma queda de pH nos tratamentos RSBio40 e RSBio60 para valores de 6,9 e 7,1, respectivamente, o que sustenta a hipótese de que um processo de digestão ácida da matéria orgânica estaria se iniciando.

Segundo Vadlamani, et al. (2017), o gênero *Chlorella* é resiliente a condições extremas de pH alcalino. Em valores de pH abaixo de 9,2, como observado nesta pesquisa, a fração iônica de nitrogênio (íon amônio) é dominante. A manutenção do pH médio até níveis alcalinos baixos permite a existência desta forma iônica não tóxica. (NAGARAJAN et al., 2019).

6.6.3 Remoções no substrato

6.6.3.1 Demanda Química de Oxigênio

A maior remoção de DQO (69,3%; $p < 0,05$) ocorreu no tratamento RSBio40, representando uma queda absoluta de 2.404,8 mg L⁻¹ em relação ao dia 0. Remoções de 60,0% (2.027,9 mg L⁻¹), 22,0% (794,9 mg L⁻¹) e 8,0% (292,0 mg L⁻¹) de DQO foram observadas nos tratamentos RSBio60, RSBio10 e RSBio0, respectivamente. Ao final do período avaliado, a menor concentração de DQO foi observada no tratamento RSBio40 (1.065,3 mg L⁻¹; $p < 0,05$), inferior à dos tratamentos RSBio60 (1.354,3 mg L⁻¹), RSBio10 (2.820,2 mg L⁻¹) e RSBio0 (3.359,3 mg L⁻¹).

De acordo com Wang et al. (2015), *C. vulgaris* pode utilizar com eficiência nutrientes e DQO de águas residuárias de suínos, com eficiência de remoção de DQO de até 76%. No estudo de Hu et al. (2012), esta cepa teve um bom crescimento neste tipo de efluente quando enriquecido com ácidos orgânicos voláteis diluídos da fermentação acidogênica, apresentando remoção de DQO de 458,4 mg L⁻¹ (12,5 %) após 5 dias de cultivo em batelada, em escala laboratorial.

No cultivo de *C. zofingiensis* em água residuária de suínos diluída (concentração inicial de DQO de 1.900 mg L⁻¹), Zhu et al. (2013) verificaram remoção de 79,8% de DQO após 7 dias de ensaio.

Um consórcio de *Chlorella spp.* e *Scenedesmus spp.* foi cultivado por Kumar et al. (2018) para tratar resíduo de suíno cuja concentração inicial de DQO era de 1.200 mg L⁻¹. Após 18 dias de cultivo, os autores observaram remoção de 56% da DQO.

Contrariamente aos seus próprios resultados de outros estudos, Marjakangas et al. (2015) identificaram aumento de 6 vezes (354,4 mg L⁻¹) na concentração de DQO_{solúvel} após 8 dias de cultivo de *C. vulgaris* em resíduo suíno digerido diluído, demonstrando que espécies semelhantes à *Chlorella* podem liberar o carbono total assimilado na forma de compostos orgânicos extracelulares.

6.6.3.2 Nitrogênio Amoniacal

Não houve variação expressiva na concentração de nitrogênio amoniacal em RSBio0 ao longo do período avaliado, sendo que o valor médio foi de 399,2 ± 17,1 mg N-amoniacoal L⁻¹. As maiores remoções de nitrogênio amoniacal (80,0 e 77,6%; p<0,05) ocorreram respectivamente nos tratamentos RSBio60 e RSBio40 e correspondem a reduções absolutas de 139,15 e 188,78 mg N-amoniacoal L⁻¹ em relação ao dia 0. Remoção de 34,5% (120,5 mg N-amoniacoal L⁻¹) foi observada no tratamento RSBio10. Ao final do período estudado, as menores concentrações de nitrogênio amoniacal foram observadas nos tratamentos RSBio60 e RSBio40 (34,9 e 54,7 mg N-amoniacoal L⁻¹; p<0,05), inferior à dos tratamentos RSBio10 (229,1 mg N-amoniacoal L⁻¹) e RSBio0 (392,4 mg N-amoniacoal L⁻¹).

Zhu et al. (2013) cultivaram *C. zofingiensis* em água residuária de suíno diluída (concentração inicial de 83,2 mg N-Total L⁻¹) e verificaram 82,7% de remoção de nitrogênio total. Este mesmo tipo de efluente, após ser enriquecido com ácidos orgânicos voláteis, foi utilizado por Hu et al. (2012) para cultivar *C. vulgaris*. Ao final de 5 dias de cultivo, os autores observaram remoção média de 69,5 mg N-Total L⁻¹, correspondente a 31,6% da concentração inicial.

Em ensaios realizados com mistura na proporção de 3:1 (v/v) de esgoto sanitário e resíduo de suinocultura previamente tratada em Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente, com concentrações iniciais superiores a 170 mg N-NH₃ L⁻¹, Leite et al. (2019) obtiveram 100% de remoção de N-NH₃ a partir de 4 dias de cultivo de *C. sorokiniana* neste resíduo.

Os estudos de Deng et al. (2017) revelaram que *C. vulgaris* cresceu melhor em resíduo suíno digerido não autoclavado e diluído em três vezes (concentração inicial de 125 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ e de 230 mg N-Total L⁻¹), apresentando eficiência de remoção de 99,8% para N-NH₄⁺ e de 67,4% para N-Total.

O crescimento de cultura mista de microalgas predominante composta por *Chlorella* sp. em sistema aberto mostrou potencial de remoção de $63,7 \pm 12$ mg N-NH₄⁺ L⁻¹ dia⁻¹ do resíduo suíno digerido de forma anaeróbia (AYRE; MOHEIMANI; BOROWITZKA, 2017).

Em estudo sobre o cultivo mixotrófico de *C. pyrenoidosa* em água residuária de suínos, Wang et al. (2012) observou que a taxa de remoção de N-NH₃ foi superior a 90% em todas as amostras diluídas, sendo que a máxima remoção (95,1%) ocorreu em resíduo com concentração inicial de 70 N-NH₃ mg L⁻¹.

De Godos et al. (2009) apontaram eficiências de remoção entre 94 e 100% para N-NH₄⁺ após cultivar, por 7 dias, *C. sorokiniana* em consórcio com bactérias nativas de lodo ativado em fotobiorreator tubular de biofilme alimentado continuamente com água residuária de suínos pré-tratada, com concentração inicial de 656 mg N-NH₄⁺ L⁻¹.

Estudo semelhante foi realizado por Hernández et al. (2013), que alcançaram eficiência de remoção de 82,7% utilizando o mesmo consórcio e o mesmo substrato, porém em sistema aberto suspenso com concentração inicial de 12,3 mg N-NH₄⁺ L⁻¹.

González-Fernandes, Molinuevo-Salces e García-González (2011) avaliaram a remoção de N-NH₄⁺ no cultivo de um consórcio algas-bactérias nativas de água residuária de suínos. Os autores verificaram que, independentemente de o resíduo utilizado ser bruto ou digerido, foi possível remover até cerca de 94% de N-NH₄⁺ após 10 dias de cultivo, o que representou mais de 300 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ em ambos os casos.

Outro consórcio de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlamydomonas reinhardtii*) foi cultivado em águas residuárias de suínos por Molinuevo-Salces et al. (2016) com concentrações de 60 a 300 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, com intuito de tratá-las. Nesse experimento, o consórcio removeu 99% de N-NH₄⁺ das águas residuais em todos os tratamentos, sendo que nos primeiros oito dias de operação foi possível notar cerca de 70 % de remoção.

Remoção de 81,1% de N-amoniaco (729,9 mg N-amoniaco L⁻¹) foi observada em ensaio realizado por Dinnebier et al. (2021) que cultivou, em escala laboratorial, *C. sorokiniana* em resíduo suíno biodigerido por 10 dias, mantendo o pH entre 7,0 e 7,5.

Esta mesma espécie foi cultivada em simbiose com bactérias de lodo ativado por Godos et al. (2010), que avaliaram a capacidade desse consórcio em remover nitrogênio de águas residuárias de suínos diluídas 4 e 8 vezes (concentrações iniciais de 350 e 190 mg N-NH₄⁺ L⁻¹, respectivamente). Os autores apontaram eficiências de remoção de $21 \pm 4\%$ e $25 \pm 13\%$ de N-NH₄⁺ para as respectivas diluições.

Após cultivarem *C. vulgaris* por 12 dias em lagoa aberta contendo água residuária de suinocultura previamente tratada por via anaeróbia, Wang et al. (2016) observaram remoção de 89,5% de N-Total, equivalente a 43,8 mg N-Total L⁻¹.

Nos estudos de Kumar et al. (2018), um consórcio de espécies de microalgas incluindo as dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* foi capaz de remover 50% de N-Total (295 mg N-Total L⁻¹) e 59% de N-NH₄⁺ (36,5 mg N-NH₄⁺ L⁻¹) de resíduo suíno, após cultivo por 18 dias.

Após 12 dias de cultivo de *C. vulgaris* em água residuária de suínos não diluída (concentração inicial de 313,3 ± 19,4 mg N-Total L⁻¹), Wen et al. (2017) verificou remoção de 90,5% de N-Total.

Também foi observada remoção de 85% de N-total (844,9 mg N-Total L⁻¹) após 176 dias de cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto operado com tempo de retenção hidráulica de 27 dias para tratar água residuária de suínos (GARCÍA et al., 2018).

6.6.3.3 Ortofosfato

Com relação ao ortofosfato, não houve variação expressiva de suas concentrações em RSBio0 entre os dias 2 e 15, sendo que, neste período, o valor médio foi de 18,3 ± 0,6 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹. Entretanto, no início e no final do ensaio (dias 0 e 18), os valores deste nutriente foram sutilmente menores neste tratamento, 13,5 e 15,1 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹, respectivamente. A maior remoção de ortofosfato (39,0%; p<0,05) ocorreu no tratamento RSBio40 e representa redução absoluta de 4,95 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ em relação ao dia 0. Remoções de 34,8% (5,1 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹) e 23,9% (2,5 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹) foram observadas respectivamente nos tratamentos RSBio10 e RSBio60. Entretanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de ortofosfato observadas ao final do período avaliado nos tratamentos RSBio10, RSBio40 e RSBio60 (p>0,05).

Deng et al. (2017) cultivaram *C. vulgaris* em resíduo suíno digerido e diluído 3 vezes (concentração inicial de 38,9 mg P-Total L⁻¹) e verificaram remoções entre 49,3% e 54,4% de P-Total ao final de 7 dias.

Em cultivo de *C. zofingiensis* em água residuária de suínos diluída, contendo 84,7 mg P-Total L⁻¹, Zhu et al. (2013) observaram, após 10 dias de ensaio, remoção de 98,2% de P-Total. Com *C. sorokiniana*, Godos et al. (2010) observaram remoção de 54% de P-Total ao final de 18 dias de cultivo em resíduo suíno diluído contendo inicialmente 19,4 mg P-Total L⁻¹.

Um consórcio de *C. sorokiniana* e bactérias nativas de lodo ativado foi cultivado por De Godos et al. (2009) em fotobiorreator tubular de biofilme contendo água residuária de suínos pré-tratada, com concentração inicial de 117 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹. Tais autores relataram eficiências de remoção entre 70 e 90% para P-PO₄³⁻ ao final de 7 dias de cultivo.

C. vulgaris crescida por 5 dias em água residuária de suínos, bruta e esterilizada, enriquecidas com ácidos orgânicos voláteis, removeu 12,0 e 17,9 mg PO₄³⁻ L⁻¹, respectivamente (21,8 e 32,5% da concentração inicial) (HU et al., 2012).

Nam et al. (2017) apontaram remoção de 97,6% de P-PO₄³⁻ quando cultivaram *C. vulgaris* por 12 dias em água residuária de suínos diluída 8 vezes (concentração inicial de 19,9 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹).

Após 12 dias de cultivo de *C. vulgaris* em água residuária de suínos não diluída (concentração inicial de 56,2 ± 12,4 mg P-Total L⁻¹), Wen et al. (2017) observaram eficiência de remoção de 91,5% de P-Total.

Remoção de mais de 90% de ortofosfato (superior a 25 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹) foi observada em ensaio realizado por Dinnebier et al. (2021), ao cultivarem, em escala laboratorial, *C. sorokiniana* em resíduo suíno biodigerido por 10 dias, mantendo o pH entre 7,0 e 7,5.

Após 176 dias de ensaio, García et al. (2018) verificaram remoção de P-Total de 92% (20,7 mg P-Total L⁻¹) por meio do cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto tratando água residuária de suínos e operado com 27 dias de tempo de retenção hidráulica.

Ganeshkumar et al. (2018) cultivaram de *Chlorella* sp. por 10 dias em água residuária de suínos misturada com a de vinícola e encontraram que, na proporção de 20:80 (suíno:vinícola), foi alcançada a melhor remoção de P-PO₄³⁻ (56,6%), equivalente a 6,2 mg P-PO₄³⁻ L⁻¹.

Franchino et al. (2016) cultivaram *C. vulgaris* em digestado diluído proveniente da digestão anaeróbia de dejetos de suínos e de milho e observaram remoção de P-PO₄³⁻ superior a 90% a partir de 4 dias de cultivo, com eficiência média de recuperação de 2,4 mg L⁻¹ dia⁻¹.

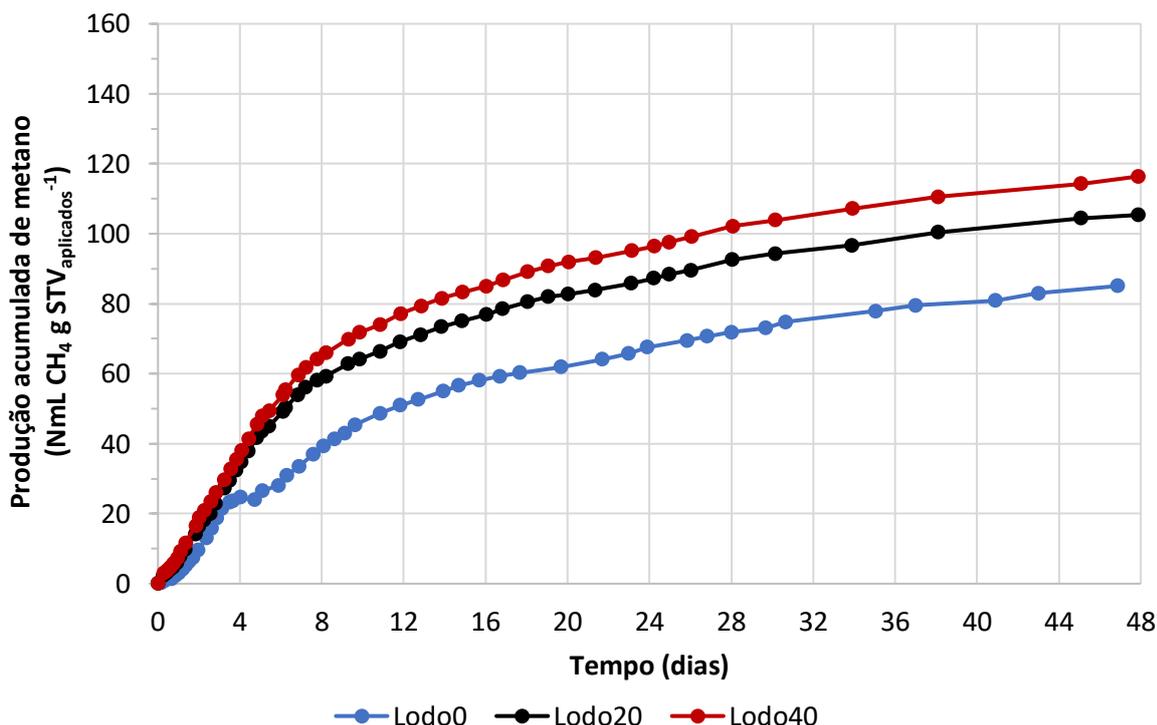
6.7 Caracterização do Lodo do Biodigestor

O lodo do biodigestor utilizado tanto no ensaio de biodegradabilidade anaeróbia como no ensaio de codigestão de microalgas apresentava as seguintes características: pH de 7,2, DQO de 236,95 g L⁻¹ e sua biomassa (180,79 g L⁻¹ de sólidos totais) era composta por 86,0% de sólidos orgânicos (155,48 g L⁻¹) e de 14,0% de sólidos inorgânicos (25,31 g L⁻¹).

6.8 Ensaio de Biodegradabilidade Anaeróbia

A produção acumulada de metano está expressa em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos (Figura 26).

Figura 26 – Produção acumulada de metano em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia.



Fonte: próprio autor.

Os microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia, principalmente os responsáveis pela metanogênese, não demandaram longo tempo para adaptação ao sistema, devido ao fato de terem sido extraídos do leito de um biodigestor de resíduo suíno. Até o 3º dia de ensaio, as produções acumuladas de metano foram similares em todos os frascos reatores, variando entre 21,5 e 30,3 NmL CH₄ g STV aplicados⁻¹, correspondente a produtividades entre 7,2 e 10,1 NmL CH₄ g STV aplicados⁻¹ dia⁻¹.

As produtividades de metano decaíram bruscamente a partir do 4º dia em Lodo0 e a partir do 6º dia em Lodo20 e Lodo40, atingindo valores de 1,8, 2,2 e 2,4 NmL CH₄ g STV aplicados⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, quando avaliado a partir destas datas até o último dia de ensaio.

Ao final do período estudado (48 dias), as produções acumuladas de metano nos tratamentos Lodo20 (105,4 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹) e Lodo40 (116,4 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹) foram superiores em 23,9% e 36,8%, respectivamente, à do Lodo0 (85,1 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹).

Dinnebier et al. (2021) apontaram potencial bioquímico de produção de metano de 292 ± 10 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹ após 35 dias de monodigestão da biomassa de *C. sorokiniana* cultivada em resíduo suíno biodigerido. Por meio da digestão anaeróbia de *C. vulgaris* crescida em água residuária urbana, Caporgno et al. (2015) observaram 415 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹.

Estimativas da produção de metano foram calculadas considerando os valores de DQO correspondentes ao inóculo de microalgas e ao lodo (Tabela 20).

Tabela 20 – Produção estimada de metano* com base na DQO do inóculo de microalgas e do lodo.

Tratamento	Microalgas			Lodo			Total		
	DQO (g)	Produção estimada de CH ₄ (NmL) (%)		DQO (g)	Produção estimada de CH ₄ (NmL) (%)		DQO (g)	Produção estimada de CH ₄ (NmL)	Produção mensurada de CH ₄ (mL)
Lodo0	0,00	0,0	0,0	1,11	388,5	100,0	1,11	388,5	396,4
Lodo20	0,02	7,0	1,8	1,11	388,5	98,2	1,13	395,5	493,1
Lodo40	0,06	21,0	5,1	1,11	388,5	94,9	1,17	409,5	547,0

Fonte: próprio autor.

Nota: * considerando a produção 350 NmL CH₄ g DQO⁻¹ (relação estequiométrica ideal nas Condições Normais de Temperatura e Pressão (CNTP)).

As produções mensuradas de metano foram superiores às estimadas em 2,0%, 24,7% e 33,6% para os tratamentos Lodo0, Lodo20 e Lodo40, respectivamente. Evidencia-se que, em todos os tratamentos, mais de 90% do volume produzido de metano tenha sido decorrente de conversões da matéria orgânica presente no lodo.

Pela análise da Figura 26 e Tabela 20, observa-se que, na medida em que foi sendo incrementado inóculo de microalgas nos tratamentos, a produção de metano foi aumentando. (aumento de 24,4% entre Lodo0 e Lodo20 e de 10,9% entre Lodo20 e Lodo40). Isso deveu-se ao acréscimo progressivo de matéria orgânica referente à biomassa das microalgas, conferindo maiores valores de DQO total nos tratamentos.

Assim como observado neste ensaio, Dinnebier et al. (2021) também notaram que a adição de biomassa de microalgas (*C. sorokiniana*) no processo de biodigestão de resíduo suíno proporcionou aumento de 32,1% na produção de biogás.

Para todos os tratamentos do ensaio de biodegradabilidade anaeróbia, foram estimados a fração degradável da matéria orgânica presente, o potencial produtivo de metano e as eficiências alcançadas com base nas observações de consumo de DQO e de produção de metano (Tabela 21).

Tabela 21 – Estimativas da fração degradável de matéria orgânica, do potencial produtivo de metano e das eficiências de consumo de DQO e de produção de metano no ensaio de biodegradabilidade.

Parâmetro	Tratamento		
	Lodo0	Lodo20	Lodo40
STV _{aplicados} (g)	4,66	4,68	4,69
A DQO _{inicial} (g)	1,11	1,13	1,17
Fração degradável (%) *	23,8	24,2	25,0
B Potencial produtivo de CH ₄ (NmL) **	388,5	395,5	409,5
C DQO consumida estimada (g) **	1,1	1,4	1,6
Fração degradada estimada (%)	24,3	30,1	33,3
D Volume de CH ₄ produzido (NmL)	396,4	493,1	547,0
Eficiência (%)			
C/A - de consumo de DQO ***	102,0	124,7	133,6
D/B - de produção de CH ₄ ****	102,0	124,7	133,6

Fonte: próprio autor.

Nota: *razão entre DQO_{inicial} e STV_{aplicados}; ** considerando a produção de 350 NmL CH₄ g DQO⁻¹ (relação estequiométrica ideal nas CNTP); *** valores estimados em relação aos potenciais; **** valores observados em relação aos potenciais.

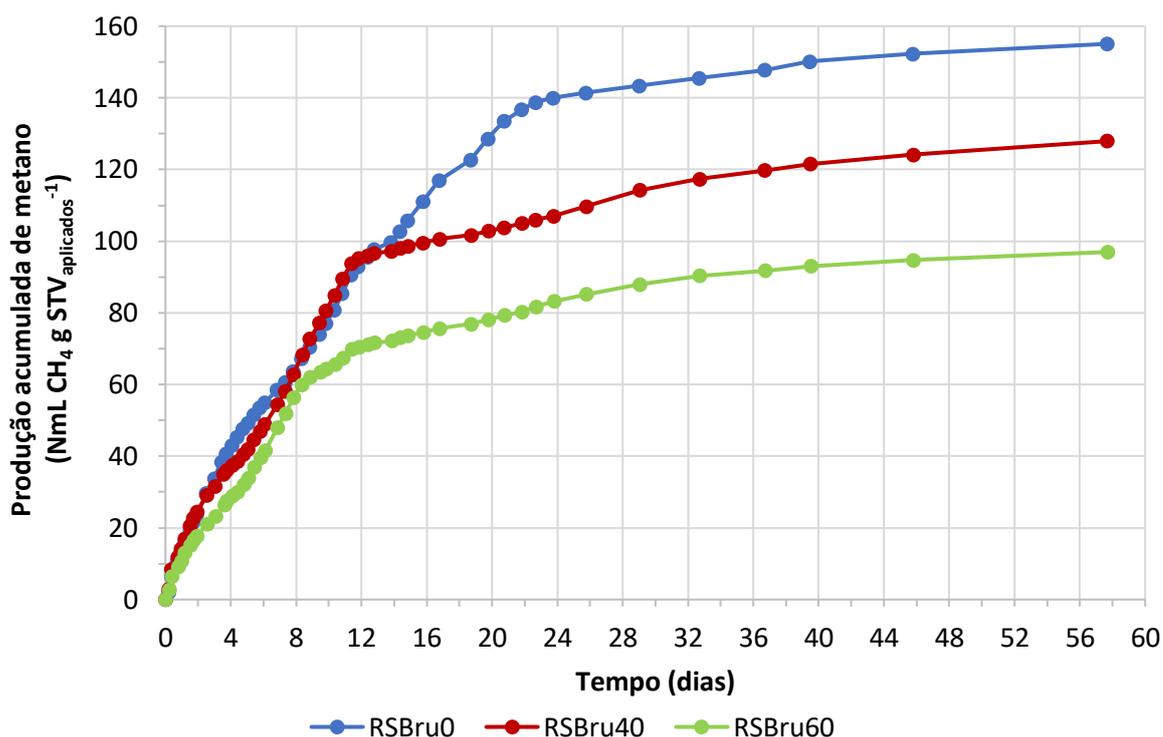
Em todos os tratamentos, o volume de metano produzido superou o estimado, sugerindo que, ao final do ensaio, a fração de biomassa degradada tenha sido superior à degradável (estimada com base na DQO_{inicial}), o que resultou em valores de eficiências de consumo de DQO e de produção de metano superiores a 100%. O tratamento que apresentou as maiores eficiências em ambos parâmetros foi o Lodo40 (133,6%).

Verificou-se, então, haver indícios de uma tendência de aumento na produção de metano com o aumento da densidade celular de microalgas. Neste sentido, no ensaio de codigestão de microalgas em resíduo suíno bruto, foram utilizadas densidades celulares de 4×10^6 e 6×10^6 células mL⁻¹, além de um tratamento sem inóculo de microalgas para efeito comparativo.

6.9 Ensaio de Codigestão de Microalgas com Resíduo Suíno Bruto

Assim como no ensaio anterior, a produção acumulada de metano está expressa em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos (Figura 27).

Figura 27 – Produção acumulada de metano em função da quantidade de sólidos totais voláteis aplicada nos tratamentos do ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Em todos os tratamentos, a fase adaptativa dos microrganismos metanogênicos foi imperceptível, não sendo possível identificá-la graficamente. Ao final de 8 dias de ensaio, as produções acumuladas de metano foram similares em todos os tratamentos, variando entre 56,4 e 63,7 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹ (correspondente a produtividades entre 7,0 e 8,0 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹ dia⁻¹).

Ao longo do ensaio, em todos os tratamentos foram identificadas algumas tendências de estabilização seguidas de novas fases de incremento da produção de metano. Contudo, as quedas mais expressivas de produtividade puderam ser notadas a partir do 8º dia para RSBru60, do 12º dia para RSBru40 e do 22º dia para RSBru0, cujos valores decaíram para 0,8, 0,7 e 0,5 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹ dia⁻¹, respectivamente, quando avaliadas destas datas até o último dia de ensaio.

Ao final do período estudado (58 dias), a produção acumulada de metano no tratamento RSBru0 (155,1 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹) foi superior em 21,2% à do RSBru40 (127,9 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹) e em 59,9% à do RSBru60 (97,0 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹).

Estimativas da produção de metano foram calculadas com base na DQO do substrato (microalgas e RSBru) e do lodo (Tabela 22).

Tabela 22 – Produção estimada de metano* com base na DQO do substrato (microalgas e RSBru) e do lodo.

Tratamento	Microalgas + RSBru			Lodo			Total		
	DQO (g)	Produção estimada de CH ₄		DQO (g)	Produção estimada de CH ₄		DQO (g)	Produção estimada de CH ₄	
		(NmL)	(%)		(NmL)	(%)		(NmL)	(NmL)
RSBru0	8,6	3.000	40,9	12,4	4.300	59,1	21,0	7.300	7.400
RSBru40	2,7	1.000	18,7	12,4	4.300	81,3	15,1	5.300	5.900
RSBru60	1,7	600	12,1	12,4	4.300	87,9	14,1	4.900	4.400

Fonte: próprio autor.

Nota: * considerando a produção de 350 NmL CH₄ g DQO⁻¹ (relação estequiométrica ideal nas CNTP).

Em todos os tratamentos, a produção mensurada de metano foi similar à estimada, indicando que houve uma boa conversão de matéria orgânica pela rota metanogênica. Contudo, o lodo parece ter contribuído mais do que o substrato neste processo. Ou seja, para todos os tratamentos, estimou-se que mais de 50% do volume produzido de metano tenha sido decorrente de conversões da matéria orgânica presente no lodo.

Ao contrário do observado no ensaio de biodegradabilidade, na medida em que os tratamentos foram contendo maiores volumes de inóculo de microalgas e, concomitantemente, menores volumes de RSBru, a contribuição do lodo para a produção de metano tornou-se cada vez mais evidente.

Isso se deveu à redução progressiva de DQO total na confecção dos tratamentos, antes ainda de ser dado início ao processo de biodigestão anaeróbia, porque o volume de RSBru (de maior carga orgânica) foi sendo substituído pelo inóculo de microalgas (de menor carga orgânica). Além disso, os microrganismos anaeróbios presentes no lodo tendem a preferir o RSBru às microalgas como fontes de matéria orgânica, devido ao fato de que o lodo utilizado é proveniente de um biodigestor que já trata este tipo de resíduo.

Para todos os tratamentos, foram estimados a fração degradável da matéria orgânica presente, o potencial produtivo de metano e as eficiências alcançadas com base nas observações de consumo de DQO e de produção de metano (Tabela 23).

Tabela 23 – Estimativas da fração degradável de matéria orgânica, do potencial produtivo de metano e das eficiências de consumo de DQO e de produção de metano no ensaio de codigestão.

Parâmetro	Tratamento		
	RSBru0	RSBru40	RSBru60
STV _{aplicados} (g)	47,5	46,1	45,4
A DQO _{inicial} (g)	23,0	16,9	13,9
Fração degradável (%) *	48,5	36,7	30,6
B Potencial produtivo de CH ₄ (NmL) **	8.050,0	5.915,0	4.865,0
C DQO consumida observada (g)	22,9	16,8	13,2
Fração degradada observada (%)	48,3	36,5	29,1
D Volume de CH ₄ produzido (NmL)	7.365,7	5.897,1	4.403,3
Eficiência (%) ***			
C/A - de consumo de DQO	99,7	99,5	95,1
D/B - de produção de CH ₄	91,5	99,7	90,5

Fonte: próprio autor.

Nota: *razão entre DQO_{inicial} e STV_{aplicados}; **considerando a produção de 350 NmL CH₄ g DQO⁻¹ (relação estequiométrica ideal nas CNTP); ***valores observados em relação aos potenciais.

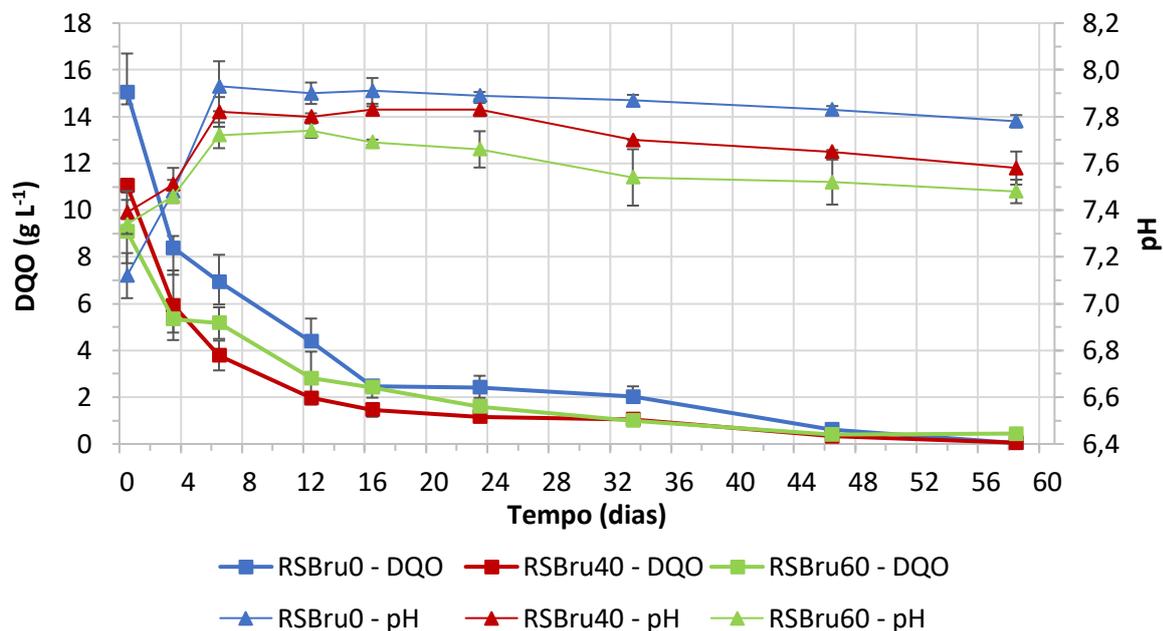
Em RSBru0, observou-se os maiores valores de fração degradável e de sólidos voláteis e, portanto, foi estimado um maior potencial produtivo de metano em comparação aos demais tratamentos (superior em 36,1% em relação ao RSBru40 e em 65,5% em relação ao RSBru60).

O tratamento que apresentou maior eficiência de consumo de DQO (99,7%) foi o RSBru0. Contudo, em relação à produção de metano, o tratamento mais eficiente foi o RSBru40, também com 99,7%.

O monitoramento do consumo da DQO e do pH ao longo do ensaio de codigestão está representado na Figura 28.

Os valores de pH aumentaram entre os dias 0 e 6 para RSBru0 (de 7,1 para 7,9), RSBru40 (de 7,4 para 7,8) e RSBru60 (de 7,3 para 7,7). A partir de então, houve uma lenta redução até o alcance dos valores de 7,8, 7,6 e 7,5, respectivamente, ao final do período experimental. A manutenção do pH entre 7,0 e 7,9 indica que o meio reacional se manteve tamponado, ainda que não tenha sido adicionado alcalinizante. As variações observadas dentro desta faixa de valores podem estar correlacionadas à produção e ao consumo de ácidos orgânicos ao longo do tempo, comportamento intrínseco ao processo de biodigestão anaeróbia.

Figura 28 – Monitoramento das variáveis DQO e pH no ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Nota: barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Para todos os tratamentos, a taxa de redução de DQO foi mais intensa até o 16º dia, representando, até este período, reduções de 83,5% (RSBru0), 86,8% (RSBru40) e 73,4% (RSBru60) do valor inicial (Figura 28, Tabela 24).

Tabela 24 – Comparação da remoção de DQO entre os ensaios de codigestão e de remoção de nutrientes.

Tratamento	DQO _{inicial} (g L ⁻¹)	DQO _{final} (g L ⁻¹)	Δ DQO (g L ⁻¹)	Remoção de DQO (%)
Ensaio de codigestão - 58 dias				
RSBru0	15,0	0,0	15,0	99,7
RSBru40	11,0	0,1	11,0	99,5
RSBru60	9,1	0,4	8,6	95,1
Ensaio de codigestão - 16 dias				
RSBru0	15,0	2,5	12,6	83,5
RSBru40	11,0	1,5	9,6	86,8
RSBru60	9,1	2,4	6,7	73,4
Ensaio de remoção de nutrientes - 18 dias				
RSBio0	3,7	3,4	0,3	8,0
RSBio40	3,5	1,1	2,4	69,3
RSBio60	3,4	1,4	2,0	59,9

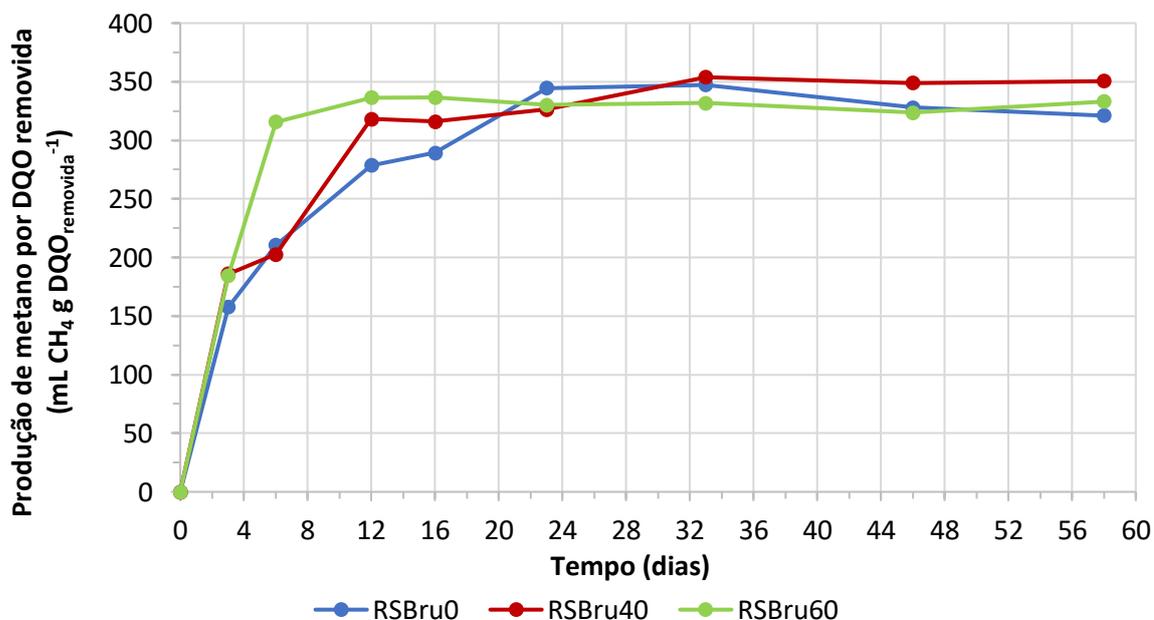
Fonte: próprio autor.

Ao final do ensaio, as remoções totais de DQO foram de 99,7% (RSBru0), 99,5% (RSBru40) e 95,1% (RSBru60), atingindo valores de concentrações inferiores a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ em todos os tratamentos.

O percentual de remoção de DQO após 16 dias do ensaio de codigestão foi maior que o alcançado após 18 dias no ensaio de remoção de nutrientes, comparando-se os tratamentos que foram inoculados com a mesma densidade celular de microalgas. Contudo, é importante ressaltar que, no ensaio de codigestão, utilizou-se RSBru, enquanto no estudo de remoção de nutrientes, utilizou-se RSBio. Ou seja, no primeiro caso, o resíduo ainda tinha alto potencial de biodegradabilidade, e no segundo, o resíduo já tinha sido passado pelo processo de biodigestão anaeróbia no local de coleta.

Após 12 dias do início do ensaio de codigestão, RSBru40 e RSBru60 produziram mais de $300 \text{ NmL CH}_4 \text{ g DQO}_{\text{removida}}^{-1}$ (Figura 29). A partir do 23º dia, todos os tratamentos mantiverem suas produções entre 320 e $350 \text{ NmL CH}_4 \text{ g DQO}_{\text{removida}}^{-1}$, ainda que RSBru0 tenha apresentado quedas progressivas a partir do 46º dia. Considerando o valor máximo teórico de $350 \text{ NmL CH}_4 \text{ g DQO}^{-1}$ (obtido por estequiometria), pode-se afirmar que RSBru40 foi o tratamento que se manteve mais eficiente por mais tempo.

Figura 29 – Produção de metano em relação à remoção de DQO no ensaio de codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Há indícios de que a presença de microalgas juntamente ao RSBru pode favorecer o aumento e a estabilidade da eficiência de produção de metano. Entretanto, novos ensaios que

envolvam outras densidades celulares de microalgas e maior tempo de monitoramento são necessários para que se confirme tal tendência.

Utilizando consórcio de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlamydomonas reinhardtii*) para tratar águas residuárias de suínos, Molinuevo-Salces et al. (2016) obtiveram uma concentração de biomassa de 1,25 g SSV L⁻¹ de cultura. A biomassa obtida foi usada para produzir metano e os autores alcançaram produtividades entre 106 e 171 NmL CH₄ g DQO_{aplicada}⁻¹.

Em comparação a outros trabalhos que envolveram *Chlorella* spp. na digestão anaeróbia (Tabela 25) e, levando-se em consideração o mesmo período experimental, os tratamentos no ensaio de codigestão desta pesquisa apresentaram baixa produção de metano por grama de STV_{aplicados}, devido a seu reduzido potencial de biodegradabilidade (36,7% para RSBru40 e 30,6% para RSBru60). Entretanto, no presente estudo, foi alcançada maior eficiência de conversão de DQO em metano (produção superior a 315 NmL CH₄ g DQO⁻¹ para ambos tratamentos) em relação ao observado nos trabalhos de diversos autores.

Tabela 25 – Condições experimentais do cultivo de *Chlorella sp.*, da colheita e do processo de digestão anaeróbia e rendimentos de produção de metano.

(continua)

Espécie	Forma de cultivo	Colheita	Condição do processo de digestão anaeróbia	Condição do pré-tratamento para digestão anaeróbia	Produção de metano				Ref.
					Sem pré-tratamento		Com pré-tratamento		
					(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Escala laboratorial: frasco Duran, 26 °C, luz de LED (160 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹) com fotoperíodo 12h/12h, resíduo suíno biodigerido	Manualmente, sem separação da biomassa	16 dias, 37 °C	Não houve ensaio com	99,6 ^a	274,3 ^a	-	-	(1)
			22 dias, 37 °C	pré-tratamento	74,6 ^b	247,0 ^b	-	-	
			24 dias, 37 °C	para digestão anaeróbia	104,9 ^a	286,2 ^a	-	-	
			26 dias, 37 °C		80,3 ^b	262,2 ^b	-	-	
			26 dias, 37 °C		107,0 ^a	292,0 ^a	-	-	
			26 dias, 37 °C		83,2 ^b	271,9 ^b	-	-	
			26 dias, 37 °C		109,7 ^a	299,1 ^a	-	-	
			29 dias, 37 °C		85,2 ^b	278,3 ^b	-	-	
			29 dias, 37 °C		114,2 ^a	311,6 ^a	-	-	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: FBR, 21 °C, -, efluente não-estéril de RAFA (dejeito suíno)	Centrifugação (3.500 rpm, t=5 min)	24 dias, 37 °C	Não houve ensaio com	228,0	-	-	-	(2)
			24 dias, 37 °C	pré-tratamento					
			24 dias, 37 °C	para digestão anaeróbia					
			24 dias, 37 °C						
			24 dias, 37 °C						
			24 dias, 37 °C						
			24 dias, 37 °C						
			24 dias, 37 °C						
			24 dias, 37 °C						
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: -, -, -, efluente secundário nitrificado (resíduo suíno)	-	25 dias, condições mesofílicas	Ultrassom (200 J mL ⁻¹)	229,0	-	440,0	-	(3)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: saco de polietileno suspenso, -, -, água de estuário	Centrifugação à temperatura ambiente	30 dias, 35 °C	Não houve ensaio com	337,0	-	-	-	(4)
30 dias, 35 °C	pré-tratamento								
30 dias, 35 °C	para digestão anaeróbia								

Tabela 25 – Condições experimentais do cultivo de *Chlorella sp.*, da colheita e do processo de digestão anaeróbia e rendimentos de produção de metano.

(continuação)

Espécie	Forma de cultivo	Colheita	Condição do processo de digestão anaeróbia	Condição do pré-tratamento para digestão anaeróbia	Produção de metano				Ref.
					Sem pré-tratamento		Com pré-tratamento		
					(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	
<i>Chlorella kessleri</i>	Escala laboratorial: -, -, luz contínua branca (40 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹) meio TAP	Centrifugação (3.100 g, t=6 min)	32 dias, 38 °C	105 °C, t=24 h	335,0	-	168,0	-	(5)
<i>Chlorella sp.</i>	Escala laboratorial: erlenmeyer, 20 °C, iluminação contínua com 6 lâmpadas fluorescentes de 40 W (5000 lux), meio Zarrouk modificado	Centrifugação (3.000 rpm, t=5 min)	45 dias, 37 °C	Não houve ensaio com pré-tratamento para digestão anaeróbia	123,0	-	-	-	(6)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: FBR, 25 °C, iluminação contínua com 6 lâmpadas de neon de luz do dia de 25 W, meio Z-8 modificado	Sedimentação natural	16 dias, 35 °C	Não houve ensaio com pré-tratamento para digestão anaeróbia	-	110,0	-	-	(7)
			28 dias, 35 °C		-	180,0	-	-	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: -, 25 °C, -, iluminação contínua com lâmpada fluorescente, meio mineral salgado	Centrifugação (5.000 rpm, t=15 min)	22 dias, 35 °C	(T)	-	191,0	-	191,0	(8)
				(V)	-	-	-	217,0	
				(A)	-	-	-	287,0	
				(T+A)	-	-	-	271,0	
				(V+A)	-	-	-	~287,0	
				(T+V+A)	-	-	-	300,0	

Tabela 25 – Condições experimentais do cultivo de *Chlorella sp.*, da colheita e do processo de digestão anaeróbia e rendimentos de produção de metano.

(continuação)

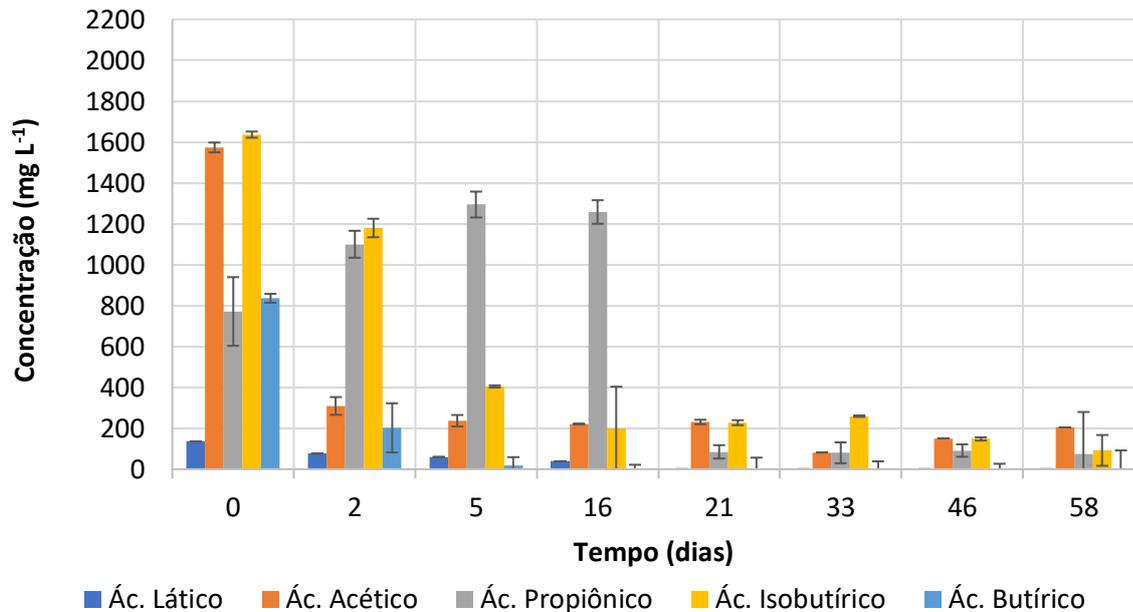
Espécie	Forma de cultivo	Colheita	Condição do processo de digestão anaeróbia	Condição do pré-tratamento para digestão anaeróbia	Produção de metano				Ref.
					Sem pré-tratamento		Com pré-tratamento		
					(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g STV _{aplicados} ⁻¹)	(NmL CH ₄ g DQO _{aplicada} ⁻¹)	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: Resíduo de ETE, 25 °C, iluminação contínua com lâmpada fluorescente, meio sintético inorgânico	Centrifugação	29 dias, 35 °C	140 °C (10 e 30 min a 3 bar)	91,0	156,0	131,0	226,0	(9)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Escala laboratorial: FBR, 25 °C, iluminação contínua com lâmpada fluorescente, meio mineral salgado	-	30 dias, 35 °C	120 °C, t=20 min - 120 °C, t=40 min - 120 °C, t=40 min +4 M H ₂ SO ₄ em pH=2 120 °C, t=40 min +4 M NaOH em pH=10 4 M H ₂ SO ₄ em pH=2 4 M NaOH em pH=10	-	139,0	-	180,0 268,0 229,0 241,0 113,0 120,0	(10)

Fontes: adaptado de Jankowska (2017). Referências citadas: (1) Este estudo; (2) Perazzoli et al. (2013); (3) Park et al. (2013); (4) Zhao et al. (2014); (5) Mussgnug et al. (2010); (6) Wang et al. (2013); (7) Ras et al. (2011); (8) Mahdy et al. (2014); (9) Mendez et al. (2014); (10) Mendez et al. (2013).

Nota: ^a RSBru40; ^b RSBru60; ETE = Estação de Tratamento de Esgoto; FBR = Fotobiorreator; RAFA = Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente; (T) = 75 °C, t=30 min (pré-tratamento antes da hidrólise enzimática); (V) = Carboidrase 0,3 mL g⁻¹, pH=5,5, banho térmico (50 °C, t=5 h), 75 °C t=15 min; (A) = Protease 0,2 mL g⁻¹, pH=8, banho térmico (50 °C, t=5 h), 75 °C t=15 min.

Os perfis de concentração dos principais ácidos graxos envolvidos na codigestão de resíduo suíno bruto com microalgas estão representados nas Figura 30, Figura 31 e Figura 32, correspondentes aos tratamentos RSBru0, RSBru40 e RSBru60, respectivamente.

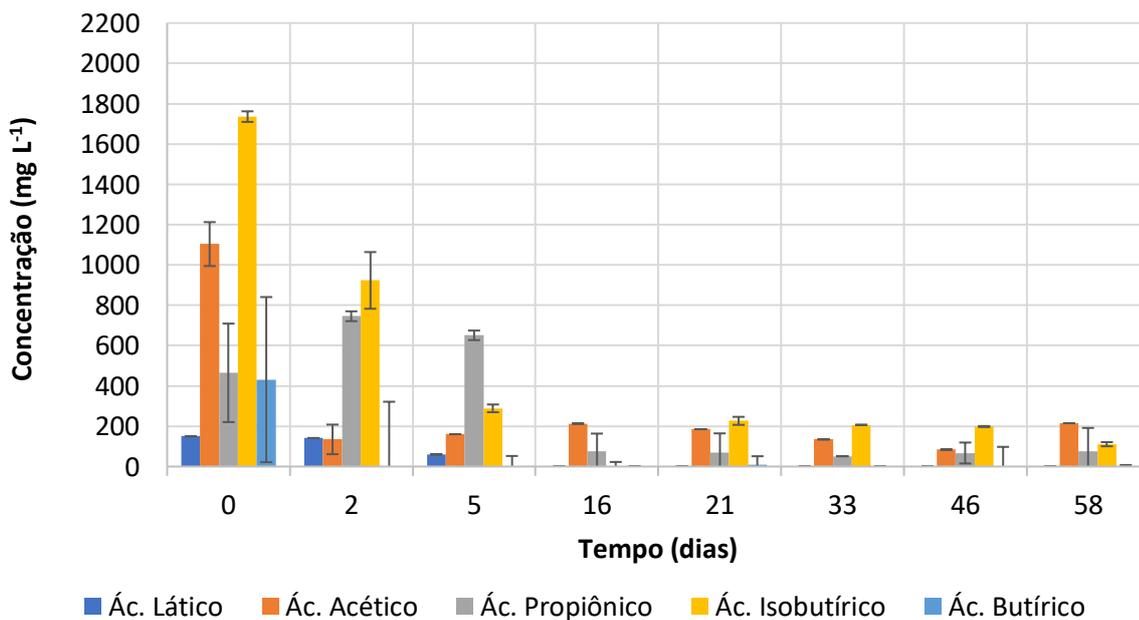
Figura 30 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru0 (sem inóculo de *Chlorella sorokiniana*) no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Nota: barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

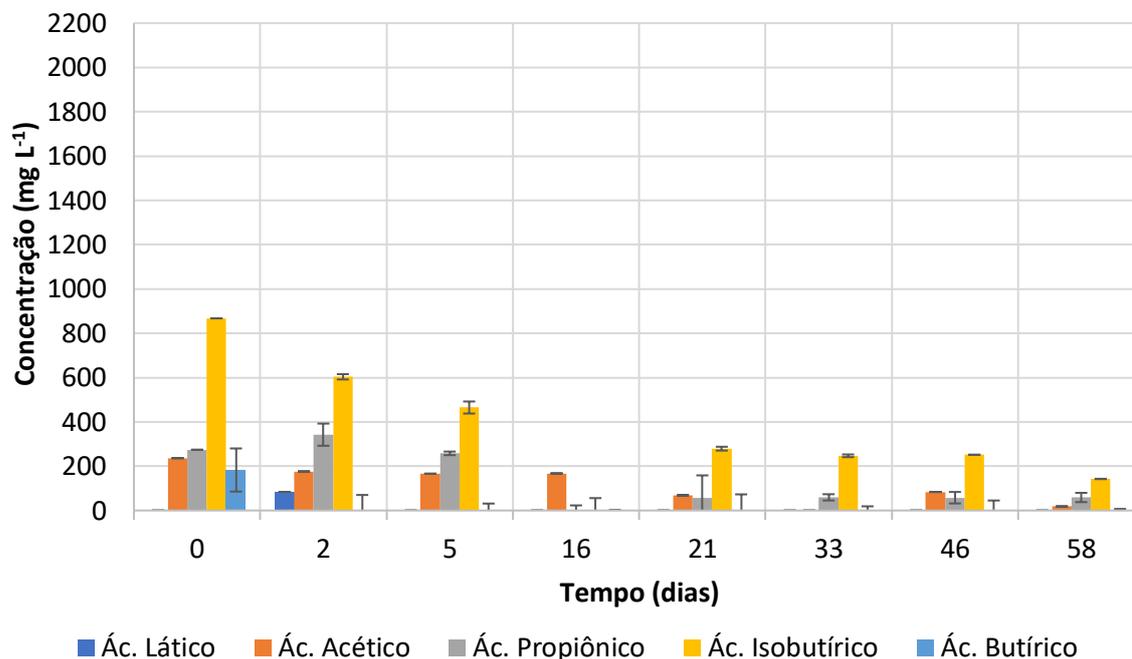
Figura 31 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru40 no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Nota: barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

Figura 32 – Perfil de concentração de ácidos graxos no tratamento RSBru60 no ensaio codigestão de microalgas com resíduo suíno bruto.



Fonte: próprio autor.

Nota: barras verticais representam o desvio padrão (n=3).

O monitoramento dos ácidos graxos permitiu acompanhar a rota metabólica do processo de digestão anaeróbia, possibilitando avaliar se estaria havendo acidificação ainda que as leituras de pH estivessem estáveis em decorrência da elevada capacidade de tamponamento (alcalinidade) do meio reacional. Foi verificado que, ao final do ensaio, em nenhum dos tratamentos houve acúmulo de ácidos graxos totais.

Os tratamentos RSBru40 e RSBru60 apresentaram concentrações iniciais (no dia 0) de ácidos graxos totais de 3.885,1 e 1.560,2 mg L⁻¹, respectivamente, sendo inferiores em 21,6 e 55,6% em relação ao tratamento em que não houve inóculo de microalgas (4.954, 2 mg L⁻¹). Tais características corroboram os resultados de produção de metano apresentados na Tabela 22.

Inicialmente (dia 0), em RSBru0, o ácido acético e ácido isobutírico perfaziam, juntos, 64,8% do total de ácidos graxos avaliados, enquanto em RSBru40 e RSBru60, estes correspondiam a 73,1 e 70,7%, respectivamente.

Ao final do ensaio, os ácidos graxos avaliados foram consumidos⁸ significativamente, sendo que, a partir do 21º dia, as concentrações destes compostos em cada

⁸ Entende-se por consumo a conversão destes compostos orgânicos em ácido acético, hidrogênio e/ou dióxido de carbono (pelas bactérias acetogênicas) que, por sua vez, podem ser convertidos em metano (pelas arqueais metanogênicas).

tratamento não ultrapassaram 300 mg L⁻¹. Estas observações condizem com os dados apresentados na Figura 29, que indicam eficiente conversão dos compostos orgânicos em metano.

De modo geral, enquanto prioritariamente ocorreu intenso consumo de ácido acético (de cadeia carbônica mais curta), houve gradativa conversão dos demais ácidos intermediários, com exceção do ácido propiônico, que se acumulou ou manteve suas concentrações até que estes outros ácidos se tornassem escassos, quando então passou também a ser utilizado significativamente.

Mediante ao exposto, pressupõe-se que houve relação sintrófica entre os microrganismos metanogênicos acetoclásticos e as bactérias acetogênicas em todos os tratamentos e, portanto, não foram identificados problemas relacionados à produção de metano, como, por exemplo, inibição ou desvios de rota.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies de maior abundância observadas nas amostras ambientais foram *Desmodesmus* sp., seguidas de *Chlorella* sp., sendo que ao fim do ensaio de aclimação em resíduo suíno biodigerido, *Chlorella sorokiniana* se destacou como a espécie mais abundante, apresentando potencial de aplicação em processos de tratamento de águas residuárias.

Quanto aos parâmetros de crescimento desta estirpe em resíduo suíno biodigerido, a validação dos modelos preditivos descritos com base no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) indicou que, embora o ajuste tenha sido melhor para $\mu_{m\acute{a}x}$ ($R^2 = 0,87$) do que para A_C ($R^2 = 0,58$), quando testado o ponto ótimo para A_C (26 °C e 160 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), houve menor variação entre os valores previstos e os reais (6,4%) do que quando testado o ponto ótimo para $\mu_{m\acute{a}x}$ (37,1 °C e 179 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (24,5%).

O ponto ótimo previsto pelo modelo preditivo para A_C serviu como condições de cultivo de *C. sorokiniana* no ensaio de remoção de nutrientes e de produção de biomassa e metabólitos. Neste experimento, foram observadas duas estratégias que podem ser aplicadas para direcionar as microalgas para objetivos distintos: a primeira delas, definida pelo cultivo desta espécie na concentração de $1,0 \times 10^6$ células mL^{-1} (RSBio10), objetiva aumentar a concentração de biomassa (em 83,8%), de clorofila *a* (em 1.869,0%) e de lipídeos (em 361,2%); e a segunda, definida pelo cultivo na concentração de $4,0 \times 10^6$ células mL^{-1} (RSBio40), tem pretensão de reduzir as concentrações de DQO (em 69,3%), de nitrogênio amoniacal (em 77,6%) e de ortofosfato (em 39,0%) no substrato e, concomitantemente, proporcionar o incremento de proteínas (em 43,7%) e de carboidratos (em 564,4%) na biomassa de microalgas.

Observados os resultados da avaliação dos fatores físicos, pressupõe-se que, nas condições de 26 °C e 160 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o aumento da densidade celular para $1,3 \times 10^7$ células mL^{-1} poderia elevar os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e de A_C (em 6,9 e 2,1 vezes, respectivamente, quando optado pela primeira estratégia, e em 23,5 e 5,6 vezes, quando optado pela segunda).

Entretanto, no ensaio de remoção de nutrientes, quando se aumentou a densidade celular para $6,0 \times 10^6$ células mL^{-1} (RSBio60), não foi observado crescimento fitoplanctônico expressivo que pudesse ser ajustado ao modelo de Gompertz para que então fosse confirmada tal suposição.

O ensaio de biodegradabilidade revelou que o lodo do biodigestor, com ou sem adição de microalgas, produziu volumes de metano superiores aos estimados. O processo de hidrólise das microalgas iniciou sem necessidade de adaptação, sendo que o tratamento em

que foram utilizadas densidades de $4,0 \times 10^6$ células mL^{-1} (Lodo40) foi o que mais produziu metano, com $116,4 \text{ NmL CH}_4 \text{ g STV}_{\text{aplicados}}^{-1}$ ao final do período estudado (48 dias).

Foi identificada uma tendência de aumento na produção de metano com o aumento da densidade celular de microalgas. Entretanto, o ensaio de codigestão revelou que não há efeito sinérgico das microalgas juntamente ao Resíduo Suíno Bruto (RSBru). Após 58 dias, o tratamento sem inóculo de microalgas (RSBru0) apresentou produção acumulada de $155,1 \text{ NmL CH}_4 \text{ g STV}_{\text{aplicados}}^{-1}$, superior em 21,2% à do tratamento em que foram utilizadas densidades celulares de 4×10^6 células mL^{-1} (RSBru40) e em 59,9% à do tratamento com densidade celular de $6,0 \times 10^6$ células mL^{-1} (RSBru60).

Em decorrência da substituição de uma fração volumétrica de RSBru (de maior carga orgânica) por inóculo de microalgas (de menor carga orgânica) no preparo dos tratamentos RSBru40 e RSBru60, houve uma redução dos teores de matéria orgânica no meio reacional. Portanto, ao contrário do observado no ensaio de biodegradabilidade, ao passo que os tratamentos foram contendo maiores volumes de inóculo de microalgas e, concomitantemente, menores volumes de RSBru, a contribuição da DQO do lodo (12,4 g) foi ficando cada vez mais evidente para a produção de metano.

Se a biomassa de microalgas tivesse sido inserida nos tratamentos de forma adensada (biomassa úmida com alta concentração de células de microalgas), de modo que pudesse aumentar ou pelo menos manter a concentração de matéria orgânica inicial, poderia ter sido observado um efeito sinérgico positivo, pois há indícios de que a presença de microalgas juntamente ao RSBru pode favorecer o aumento e a estabilidade da eficiência de produção de metano. Por não ter sido possível testar tal hipótese, não é seguro afirmar que a biomassa de microalgas seja, de fato, prejudicial ao processo de biodigestão.

Vale destacar também que os micro-organismos presentes no lodo tenderam a preferir exclusivamente o RSBru como fonte de matéria orgânica à sua mistura com microalgas, considerando que o lodo utilizado no ensaio já estava adaptado a este tipo de substrato, por ser proveniente de um biodigestor de resíduos suínos.

Em RSBru0, observou-se os maiores valores de fração degradável (48,5%) e de sólidos voláteis (47,5 g) e, portanto, foi estimado um potencial produtivo de metano superior em 36,1% em relação ao RSBru40 e em 65,5% em relação ao RSBru60. Ademais, RSBru0 apresentou a maior eficiência de consumo de DQO (99,7%), o que resultou na produção acumulada de mais de 7.300 NmL de metano ao final do ensaio.

De modo geral, ao final do ensaio de codigestão, não houve acúmulo de ácidos graxos voláteis, pressupondo que houve relação sintrófica entre os microrganismos metanogênicos acetoclásticos e as bactérias acetogênicas.

8 CONCLUSÕES

A biodigestão apenas de RSBru (sem adição de cultivo de microalgas) por 58 dias pode ser uma rota sugerida para alcançar remoção de mais de 95% de DQO e produção de cerca de 155 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹.

Alternativamente, como forma de agregar valor ao cultivo de microalgas e ao tratamento de resíduos de forma simultânea, sugere-se a codigestão de resíduo suíno biodigerido com inóculo de *C. sorokiniana* (na concentração inicial de 4x10⁶ células mL⁻¹), também por 58 dias, visando atingir níveis semelhantes de remoção de DQO e produção de aproximadamente 125 NmL CH₄ g STV_{aplicados}⁻¹.

REFERÊNCIAS

- ABOU-SHANAB, R. A. I. *et al.* Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 115, p. 257–264, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
- AL-QASMI, M. *et al.* A Review of Effect of Light on Microalgae Growth. **Proceedings of the World Congress on Engineering**, [S. l.], v. I, p. 8–10, 2012.
- AMINI, H.; WANG, L.; SHAHBAZI, A. Effects of harvesting cell density, medium depth and environmental factors on biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* grown in swine wastewater. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 152, p. 403–412, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.06.025>
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Burlington, Mass.: Elsevier/Academic Press, 2005. *E-book*.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais**. Londrina: IAPAR, 2014. v. 1 *E-book*.
- ANDRADE, M. da R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 1551–1556, 2008.
- ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 125–136, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2014v35n1p115>
- APHA, A. P. H. A. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City, 2005. *E-book*.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. **Mapeamento da suinocultura brasileira** Observatorio de la Economía Latinoamericana. Brasília: [s. n.], 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2020**. [S. l.: s. n.].
- AYRE, J. M.; MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. **Algal Research**, [S. l.], v. 24, p. 218–226, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.023>

BARBOSA, M. J. G. de V. **Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation**. 2003. - Wageningen University, [s. l.], 2003. Disponível em: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/1690229>

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. Boca Ration: Taylor & Francis, 1952. *E-book*.

BAUMGARTNER, T. R. da S. *et al.* Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. **Brazilian Journal of Biosciences**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 250–255, 2013.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. *In*: RICHMOND, A. (org.). **Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 312–351. *E-book*. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470995280.ch18/summary>

BELLI FILHO, P.; CASTILHOS JUNIOR, A. B. de. **Dejetos de suínos: aspectos qualitativos, quantitativos e tecnologias para o controle da poluição ambiental**. Florianópolis: [s. n.], 1990.

BERTOLDI, F.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. Ceppa**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006. *E-book*. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:G?NEROS+DE+ALGAS+DE+?GUAS+CONTINENTAIS+DO+BRASIL#1>

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. (Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer). **Can. J. Biochem. Physiol.**, [S. l.], n. 37, p. 911–917, 1959.

BLUNDI, C. E.; GADÊLHA, R. F. metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. *In*: **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. Belo Horizonte: FINEP, 2001. *E-book*.

BORGES, C. B. **Modelagem da produção de lipídios em microalgas**. 2010. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BOUTERFAS, R.; BELKOURA, M.; DAUTA, A. Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 489, n. 1, p. 207–217, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1023241006464>

BRASIL. **Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. [S. l.]: Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA, 2011.

BRASIL. **Guia técnico de aproveitamento energético de biogás em estações de tratamento de esgoto / Probiogás**. Brasília: Ministério das Cidades., 2015. *E-book*.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>. Acesso em: 30 jul. 2013.

CAPORGNO, M. P. *et al.* Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. **Algal Research**, [S. l.], v. 10, p. 232–239, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>

CHEN, W.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 135–141, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.076>. Acesso em: 17 abr. 2016.

CHENG, D. L. *et al.* Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 275, n. October 2018, p. 109–122, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.019>

CHERNICHARO, C. A. L. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. *In*: 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Minas Gerais., 2007. v. 5p. 380. *E-book*.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F.-J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology**, Toronto, v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.

COLEMAN, A. W. A comparative analysis of the Volvocaceae (Chlorophyta). **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 491–513, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01168.x>

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ficha de Informação Toxicológica. Amônia**. Divisão de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental, 2017.

COUTTEAU, P. Micro-algae. *In*: LAVENS, P.; SORGELLOOS, P. (org.). **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization

of the United Nations (FAO), 1996. v. 361p. 7–48. *E-book*.

DANESI, E. D. G. *et al.* Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 362–373, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100046>

DAY, J. G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 127–136, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0022-0>. Acesso em: 16 set. 2014.

DE GODOS, I. *et al.* Simultaneous nutrients and carbon removal during pretreated swine slurry degradation in a tubular biofilm photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 82, n. 1, p. 187–194, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1825-3>

DEL NERY, V. **Utilização de lodo anaeróbio imobilizado em gel no estudo de partida de reatores de fluxo ascendente com manta de lodo**. 1987. - Universidade de São Paulo., [s. l.], 1987.

DENG, X. Y. *et al.* Growing *Chlorella vulgaris* on thermophilic anaerobic digestion swine manure for nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 243, p. 417–425, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.141>

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>. Acesso em: 16 set. 2014.

DIESEL, R.; MIRANDA, C. R.; PERDOMO, C. C. Boletim Informativo de Pesquisa n° 14: Coletânea de tecnologias sobre dejetos suínos. **Embrapa Suínos e Aves e Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural – EMATER/RS**, [S. l.], n. 14, p. 30, 2002.

DINNEBIER, H. C. F. *et al.* Phycoremediation and biomass production from high strong swine wastewater for biogas generation improvement: An integrated bioprocess. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 332, n. January, p. 125111, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125111>

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

ELLIOTT, L. G. *et al.* Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection. **Algal Research**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 102–113, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.002>

EMDADI, D.; BERLAND, B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Marine Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 215–225, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(89\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0304-4203(89)90004-2)

ENCYCLOPEDIA OF LIFE. **Chlamydomonadales - Sinônimos**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <http://www.eol.org/pages/3227/names/synonyms>

FERNANDES, D. M. **Biomassa e biogás da suinocultura**. 2012. - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Energia na Agricultura., Cascavel, 2012.

FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J. *et al.* Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. **Aquaculture**, [S. l.], v. 83, n. 1–2, p. 17–37, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(89\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(89)90057-4)

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action**. Rome: [s. n.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

FORESTI, E. *et al.* Fundamentos do tratamento anaeróbio. In: CAMPOS, J. R. (org.). **Tratamento de esgotos sanitários por processo anaeróbio e disposição controlada no solo**. Rio de Janeiro: Projeto PROSAB. ABES., 1999. p. 29–52. *E-book*.

FRANCHINO, M. *et al.* Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggery digestate. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 569–570, p. 40–45, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.100>

FRANCO, M. C. *et al.* Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 693–699, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9687-y>

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE. Instrução Normativa 11 - Suinocultura. **Fundação do Meio Ambiente - FATMA**, Florianópolis, p. 1–37, 2014. Disponível em: [http://www.fatma.sc.gov.br/ckfinder/userfiles/arquivos/ins/11/IN 11 Suinocultura.pdf](http://www.fatma.sc.gov.br/ckfinder/userfiles/arquivos/ins/11/IN%2011%20Suinocultura.pdf)

GANESHKUMAR, V. *et al.* Use of mixed wastewaters from piggery and winery for nutrient removal and lipid production by *Chlorella* sp. MM3. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 256, n. December 2017, p. 254–258, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.025>

GARCÍA, D. *et al.* Evaluation of the dynamics of microalgae population structure and process performance during piggery wastewater treatment in algal-bacterial photobioreactors. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 248, p. 120–126, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.079>

GATTI, I. C. de A. *et al.* Teor lipídico de duas espécies de microalgas cultivadas em resíduo suíno biodigerido. In: 2006, **II Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**. [S. l.: s. n.] p. 1–6.

GERHACOV, S. M.; HATCHER, P. G. Improved technique for analysis of carbohydrates in the sediment. **Limnology and Oceanography**1, [S. l.], v. 17, p. 938–943, 1972.

GODOS, I. de *et al.* A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 14, p. 5150–5158, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.010>

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, [S. l.], v. 24, p. 403–415, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; MOLINUEVO-SALCES, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 960–966, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.052>

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. **Phycology**, [S. l.], v. 8, p. 10–14, 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x>

GUIMARÃES, D. *et al.* Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES. **BNDES Setorial | Agroindústria**, [S. l.], v. 1, n. 45, p. 85–136, 2017. Disponível em: [https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/11794/1/BS_45_Suinocultura - estrutura da cadeia produtiva%2C panorama do setor no Brasil%5B...%5D_P.pdf](https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/11794/1/BS_45_Suinocultura_-_estrutura_da_cadeia_produtiva%2C_panorama_do_setor_no_Brasil%5B...%5D_P.pdf)

HERNÁNDEZ, D. *et al.* Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae-bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 135, p. 598–603, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.029>

HOSHAW, R. W.; ROSOWISKI, J. R. Isolation and purification - Methods for microscopic algae. In: STEIN, J. R. (org.). **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**. Cambridge: Cambridge University, 1973. p. 53–67. *E-book*.

HU, B. *et al.* Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 126, p. 71–79, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.031>

HU, Q. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant journal**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 621–39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>. Acesso em: 23 maio. 2013.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018. **Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Agropecuária**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>.

IBGE. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico. Séries Históricas**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=series-historicas>.

ITO, M.; GUIMARÃES, D.; AMARAL, G. Impactos ambientais da suinocultura: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial | Agroindústria**, [S. l.], v. 1, n. 44, p. 125–156, 2016. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/9974/1/BS_44_Impactos_ambientais_da_suinocultura_P.pdf

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 75, n. December 2016, p. 692–709, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.045>

Jl, M. K. *et al.* Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 6, p. 2701–2710, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4097-x>

KESSLER, E. Upper limits of temperature for growth in *Chlorella* (Chlorophyceae). **Plant Systematics and Evolution**, [S. l.], v. 151, n. 1–2, p. 67–71, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02418020>

KHAN, S. A. *et al.* Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 2361–2372, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.04.005>

KHOZIN-GOLDBERG, I.; COHEN, Z. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*.

Phytochemistry, [S. l.], v. 67, n. 7, p. 696–701, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>

KOMÁREK, J. *et al.* Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) using a polyphasic approach. **Preslia**, [S. l.], n. 86, p. 295–335, 2014.

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. *In*: HUBER-PESTALOZZI, G. (org.). **Das Phytoplankton des Süßwassers (Die Binnengewässer)**. Stuttgart: Schwiezerbat'sche Verlagsbuchhandlung, 1983. v. 7p. 1044. *E-book*.

KONZEN, E. A. **Avaliação quantitativa e qualitativa dos dejetos de suínos em crescimento e terminação, manejados em forma líquida**. 1980. - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1980.

KUMAR, G. *et al.* Cultivation of microalgal biomass using swine manure for biohydrogen production: Impact of dilution ratio and pretreatment. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 260, n. December 2017, p. 16–22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.029>

KUNZ, A.; OLIVEIRA, P. A. V. de; PERDOMO, C. C. **Biodigestores: avanços e retrocessos**. [S. l.]: Embrapa Suínos e Aves (CNPSA), 2008.

LATALA, A. Effects of salinity, temperature and light on the growth and morphology of green planktonic algae. **Oceanologia**, Gdynia, v. 31, n. 1991, p. 119–138, 1991.

LAVENS, P.; SORGELOOS, P. **Manual on the production and use of live food for aquaculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1996. v. 361E-*book*.

LEITE, L. de S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. **Journal of Water Process Engineering**, [S. l.], v. 31, n. March, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100821>

LOEHR, R. C. **Agricultural waste management: problem, process and approaches**. New York: Academic Press, 1974. *E-book*.

LOPES, C. R. M.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; ALVES, M. I. R. Impactos ambientais e sociais causados por voláteis emanados por excretos de suínos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 3556–3565, 2013.

LÓPEZ-PACHECO, I. Y. *et al.* Phyco-remediation of swine wastewater as a sustainable model based on circular economy. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 278, n. November 2019, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111534>

LOURENÇO, S. de O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. *E-book*.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**., [S. l.], n. 265–276, p. 193, 1951.

LUO, L. *et al.* Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 216, p. 135–141, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059>

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. Water Analysis: Some Revised Methods for Limnologists. **Freshwater Biological Association Scientific Publication**, [S. l.], n. 36, p. 120, 1978.

MAHDY, A. *et al.* Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. **Energy Conversion and Management**, [S. l.], v. 85, p. 551–557, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>

MARJAKANGAS, J. M. *et al.* Simultaneous nutrient removal and lipid production with *Chlorella vulgaris* on sterilized and non-sterilized anaerobically pretreated piggyery wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 103, p. 177–184, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.011>

MARQUEZ, U. M. L. *et al.* Chlorophylls. In: BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. (org.). **Handbook of Natural Colorants**. New Jersey: John Wiley & Sons Ltd., 2009. p. 243–254. *E-book*.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>. Acesso em: 21 maio. 2013.

MENDEZ, L. *et al.* Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 149, p. 136–141, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.136>

MENDEZ, L. *et al.* Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. **Fuel**, [S. l.], v. 117, n. PART A, p. 674–679, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.032>

MEZZARI, M. P. *et al.* Assessment of N₂O emission from a photobioreactor treating ammonia-rich swine wastewater digestate. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 149, p. 327–332, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.065>

MICHELON, W. *et al.* Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 178, n. 7, p. 1407–1419, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1955-x>

MOLINUEVO-SALCES, B. *et al.* From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. **Renewable Energy**, [S. l.], v. 96, p. 1103–1110, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.090>

MOSEY, F. E. Mathematical modeling of the anaerobic process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science Technology**, [S. l.], v. 15, p. 209–32, 1983.

MUSSGNUM, J. H. *et al.* Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 51–56, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>

NAGARAJAN, D. *et al.* Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 289, n. May, p. 121718, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121718>

NAM, K. *et al.* Cultivation of *Chlorella vulgaris* with swine wastewater and potential for algal biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 1171–1178, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0987-0>

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Chlamydomonadales - Taxonomy Browser**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3042>

NATIONAL PORK BOARD. **World Per Capita Pork Consumption - 2018**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://www.pork.org/facts/stats/u-s-pork-exports/world-per-capita-pork-consumption/>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. *E-book*.

NEN 6520. **Water – Spectrofotometrische bepaling van het gehalte aan chlorofyl-a**. [S. l.: s. n.]

NOGUEIRA, L. A. H. **Biodigestão: a alternativa energética**. São Paulo: Nobel, 1992. *E-book*.

NOVAES JUNIOR, S. de O. *et al.* Potencial de crescimento de *Chlorella vulgaris* em efluentes suínos para a produção de biodiesel. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, [S. l.], v. 2, p. 23–33, 2013.

NOVAES, R. F. V. V. Microbiology of anaerobic digestion. **Water Science and Technology**, [S. l.], v. 18, n. 12, p. 1–14, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.2166/wst.1986.0159>

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Arch. Hydrobiol. Beih. (Ergebn. Limnol.)**, [S. l.], n. 14, p. 14–36, 1980.

OHSE, S. *et al.* Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA**, Florianópolis, v. 36, n. 36, p. 39–73, 2007.

OLIVEIRA, P. A. V. de. Manual de manejo e utilização dos dejetos suínos. **Documentos / Embrapa**, Pelotas, n. 27, p. 188, 1993. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/434003>

OLIVEIRA, O. S. B. C. **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. 2009. - Universidade Nova de Lisboa., Lisboa, 2009.

OLIVEIRA, P. A. V. *et al.* **Tecnologias para o manejo de resíduos na produção de Suínos: manual de boas práticas**. [S. l.: s. n.].

PARK, K. Y. *et al.* Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 85, p. 598–602, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.035>

PARRA, O. O. *et al.* **Manual taxonomico del fitoplancton de aguas continentales: con especial referencia al fitoplancton de Chile. Classe Chlorophyceae**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.4067/S0717-71781995002300004>

PERAZZOLI, S. *et al.* Biogas production from microalgae biomass III. *In*: 2013, São Pedro. **Simpósio Internacional Sobre Gerenciamento De Resíduos Agropecuários E Agroindustriais**. São Pedro: [s. n.], 2013.

PERAZZOLI, S. *et al.* Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of

Scenedesmus spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [S. l.], v. 109, p. 23–28, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.027>

PRAJAPATI, S. K. *et al.* Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 135, p. 232–238, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.069>

PRANDINI, J. M. *et al.* Use of swine waste-derived biogas for the enhancement of microalgae productivity. In: 2015, **Anais [...]**. [S. l.: s. n.] p. 6–8.

PRANDINI, J. M. *et al.* Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae Scenedesmus spp. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 202, n. October, p. 67–75, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.082>

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700002>

RAS, M. *et al.* Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 200–206, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.146>

REVIERS, B. De. Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo. In: FRANCESCHINI, I. M. (org.). **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 19–57. *E-book*.

RIZZONI, L. B. *et al.* Biodigestão anaeróbia no tratamento de dejetos de suínos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veerínária**, [S. l.], n. 18, p. 20, 2012. Disponível em: <https://doi.org/16797353>

RODRIGUES, J. B. R.; FILHO, P. B. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, Florianópolis, v. 17, n. 2, p. 7–26, 2004. Disponível em: <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/464682.pdf>

ROSSI, R. A. **Seleção de microalgas dos gêneros Desmodesmus e Scenedesmus produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel**. 2013. - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Optimization of an analytical procedure for extraction of lipids from microalgae. **Journal of the American Oil Chemists'**

Society, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 189–198, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1903-z>

SAHA, S. K.; UMA, L.; SUBRAMANIAN, G. Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 45, n. 3, p. 263–272, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00162-4)

SANDNES, J. M. *et al.* Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: Linking cellular responses to large-scale biomass production. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 515–525, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9002-x>

SANTOS, G. M. dos; MACEDO, R. V. T. De; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas - Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 17–21, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000400004>

SANTOS, P. V. dos. **Seleção de cepas oleaginosas da microalga *Chlorella* spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel**. 2013. - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SCHMITZ, R. *et al.* Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC-UPF**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 48–60, 2012. Disponível em: <http://www.upf.tche.br/seer/index.php/ciatec/article/viewFile/2393/1767>

SCRAGG, A. H. *et al.* Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 67–73, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00028-4](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00028-4). Acesso em: 14 jun. 2013.

SIALVE, B.; BERNET, N.; BERNARD, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 409–416, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.001>

SILVA, C. R. A. *et al.* A biomassa como alternativa energética para o Brasil. **Energia e Ambiente**, [S. l.], v. 2, p. 25–36, 2005.

SILVA, C. L. da; BASSI, N. S. S. Análise dos impactos ambientais no Oeste Catarinense e das tecnologias desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves. *In*: 2012, Belém. **VI Encontro Nacional da ANPPAS**. Belém: [s. n.], 2012. p. 17. Disponível em: <http://www.anppas.org.br/encontro6/anais/ARQUIVOS/GT7-946-803-20120621110037.pdf>

SILVA, M. L. B. da. Microalgas no tratamento do efluente suinícola. **Guia Gessulli da Avicultura e Suinocultura Industrial**, [S. l.], n. November 2015, p. 32–38, 2015.

SILVA, M. O. S. A. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos.** [S. l.]: CETESB, 1977. *E-book*.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 50, p. 431–444, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>

SOUZA, C. de F. Produção de biogás e tratameto de resíduos: biodigestão anaeróbia. **Ação Ambiental**, Viçosa, n. 34, p. 26–29, 2005.

SPOLAORE, P. *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, [S. l.], v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>. Acesso em: 28 maio. 2013.

STREIT, N. M. *et al.* As clorofilas. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782005000300043>

TINOCO, N. A. B. B.; TEIXEIRA, C. M. L. L. L. L.; REZENDE, C. M. The genus *Dunaliella*: Biotechnology and applications. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1421–1440, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150078>

TOERIEN, D. F.; HATTINGH, W. H. J. Anaerobic digestion I. The microbiology of anaerobic digestion. **Water Research**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 385–416, 1969. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(69\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(69)90002-5)

TOFANA, M.; MIHAIESCU, T.; ODAGIU, A. Applications of Microalgae in Wastewater Treatments: a Review. **ProEnvironment/ProMediu**, [S. l.], v. 9, n. 28, p. 459–463, 2016.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. *In*: RICHMOND, A. (org.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. 1. ed. Oxford: Ed. Blackwell Science Ltd., 2004. p. 2–19. *E-book*.

TSUKAHARA, K. T.; SAWAYAMA, S. S. Liquid fuel production using microalgae. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 251–259, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1627/jpi.48.251>

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade.** [S. l.: s. n.].

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade.** [S. l.: s. n.].

VADLAMANI, A. *et al.* Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 7284–7294, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01534>

VAN WAGENEN, J.; DE FRANCISCI, D.; ANGELIDAKI, I. Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 1775–1782, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0485-1>

VERMA, N. M. *et al.* Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories : A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1402–1411, 2010.

VIEIRA COSTA, J. A. *et al.* Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1016822717583>

VON SPERLING, M. **Lagoas de estabilização**. 3. ed. [S. l.]: Editora UFMG, 2017. v. 3E-book.

WANG, H. *et al.* Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 104, p. 215–220, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.020>

WANG, M. *et al.* Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 142, p. 585–590, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.096>

WANG, M. *et al.* Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 222, p. 130–138, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.128>

WANG, Y. *et al.* Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 198, p. 619–625, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.067>

WEN, Y. *et al.* Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 243, p. 247–253, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.094>

YUAN, Z. *et al.* Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 137, p. 318–325, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.144>

ZHANG, B. *et al.* Sustainable production of algal biomass and biofuels using swine wastewater in North Carolina, US. **Sustainability (Switzerland)**, [S. l.], v. 8, n. 5, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su8050477>

ZHAO, B. *et al.* Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 161, p. 423–430, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.079>

ZHEN, G. *et al.* Anaerobic co-digestion on improving methane production from mixed microalgae (*Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp.) and food waste: Kinetic modeling and synergistic impact evaluation. **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 299, p. 332–341, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.118>

ZHU, L. *et al.* Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. **Water Research**, [S. l.], v. 47, n. 13, p. 4294–4302, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>

ZWIETERING, M. H. *et al.* Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 1875–81, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x>