

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

GABRIEL COSTA BLANCO

Biotecnologia de microalgas aplicada ao pós tratamento de águas residuárias e à produção de
lipídios

São Carlos
2020

GABRIEL COSTA BLANCO

Biotecnologia de microalgas aplicada ao pós tratamento de águas residuárias e à produção de lipídios

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Giovana Tommaso

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA 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).

B638b Blanco, Gabriel
Biotecnologia de microalgas aplicada ao pós
tratamento de águas residuárias e à produção de
lipídios / Gabriel Blanco; orientadora Giovana Tommaso.
São Carlos, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Programa de
Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da
Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2020.

1. Chlorella vulgaris. 2. Cinética microbiana. 3.
Fotobiorreatores. 4. Indústria de gelatina. 5. Remoção
de nitrogênio. 6. Produção de lipídios. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: **GABRIEL COSTA BLANCO**

Título da dissertação: "Biotecnologia de microalgas aplicada ao pós tratamento de águas residuárias e à produção de lipídios"

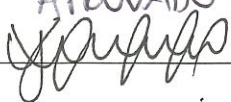
Data da defesa: 18/02/2020

Comissão Julgadora

Resultado

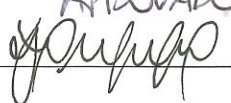
Prof^ª. Associada **Giovana Tommaso (Orientadora)**

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP)

APROVADO


Prof. Dr. **Geronimo Virginio Tagliaferro**

(Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP)

APROVADO


Prof. Dr. **Vanildo Luiz Del Bianchi**

(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp)

APROVADO


Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Paulo Cesar Prado Blanco e Debora Gonzalez Costa Blanco, pelo apoio e suporte durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha família por todo o apoio durante minha graduação e mestrado até o presente momento, e a minha namorada Thamires pelo apoio emocional.

A Profa. Dra. Giovana Tommaso pela oportunidade, orientação, dedicação e apoio para a realização dessa pesquisa, oferecendo toda infraestrutura necessária.

Aos meus amigos da Biotecnologia Ambiental, Danilo Gomes Santiago, Maria Eduarda Simões Dias, Liliane Folli, Rafaela Carvalho, Diana Quispe, Gilda Sampaio e Luiza Papa.

Aos meus amigos da República Tente da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga, Caio Valverde, Pedro Dibo, André Almeida, Matheus Claudino, Diego Soares, Luiz Felipe Diniz, Leonardo Araújo, Renan Perego, Davy Manatta, Felipe Antonioli, Felipe Nagae, João Victor Ito e Diego Poit.

Aos professores do PPG-SEA pela experiência e conhecimentos transmitidos que foram enriquecedores à minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PPG-SEA) pela oportunidade.

Aos professores da Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de Lorena pelo excelente curso oferecido e por terem despertado meu interesse em trabalhar na área de ciências ambientais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

BLANCO, G. C. **Biotecnologia de microalgas aplicada ao pós tratamento de águas residuárias e à produção de lipídios**. 2020. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Diferentes métodos de tratamento biológicos têm sido aplicados à remoção de compostos nitrogenados da água, e uma alternativa que tem se mostrado viável é o cultivo de microalgas. Esses microrganismos possuem a capacidade de assimilar altas concentrações de nitrogênio e carbono em diferentes formas, além de acumular lipídios, possibilitando a integração do tratamento de águas residuárias com a produção de biocombustível. Todavia, para que seja viável realizar cultivos em larga escala, é fundamental o conhecimento da produtividade de bio-óleo e da cinética de crescimento e consumo de substrato da microalga. Esse trabalho teve como objetivo estudar a aplicação do cultivo de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* como técnica de pós tratamento de águas residuárias e produção de lipídios. Para determinar a cinética de crescimento e a concentração de substrato ótima de operação dos fotobiorreatores (PBRs) foram feitos ensaios em frascos reatores de 500 mL, nos quais foram inoculadas microalgas em efluentes da indústria de gelatina tratados por via anaeróbia, preparados com diferentes diluições e suplementados com meio basal (BBM). Com as concentrações de biomassa quantificadas ao longo do tempo em cada condição, foram feitos ajustes não lineares ao modelo de Gompertz-modificado, para obtenção das velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$). A partir dos valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e S, foi proposto o modelo de inibição por substrato de Andrews ($R^2=0,872$), sendo determinados os parâmetros cinéticos $\mu_{m\acute{a}x}$, K_M e K_i através do software *Origin 8.0* e a concentração de substrato ótima de operação dos fotobiorreatores ($S_{opt}=37,59\text{mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$). Definida a cinética de crescimento microbiana e a tolerância das microalgas ao nitrogênio amoniacal, foi dada partida nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) em batelada de 1,0 L, sendo alcançadas velocidades específicas de crescimento máximas de $0,343\text{ d}^{-1}$, produtividade de biomassa de $0,141\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, produtividade de lipídios de $17,63\text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, e eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal e de nitrato de 98,85% e 35,48%, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram o potencial das microalgas *C.vulgaris* em integrar o pós tratamento de águas residuárias com a produção de lipídios.

Palavras chaves: *Chlorella vulgaris*. Cinética microbiana. Fotobiorreatores. Indústria de gelatina. Remoção de nitrogênio. Produção de lipídios.

ABSTRACT

BLANCO, G. C. **Microalgae biotechnology applied to wastewater post treatment and lipid production.** 2020. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Different biological treatment methods have been applied to the removal of nitrogen compounds from water, and an alternative that has been shown to be viable is microalgae cultivation. These microorganisms have the ability to assimilate high concentrations of nitrogen and carbon in different forms, as well as accumulate lipids, and this enables the integration of wastewater treatment with biofuel production. However, for large scale cultivation to be viable, knowledge of the bio-oil productivity and growth and substrate consumption kinetics of the microalgae is essential. The objective of this work was to study the application of *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation as a wastewater post treatment and lipid production technique. To determine the growth kinetics and optimal substrate concentration of the photobioreactors (PBRs), 500 mL reactor flasks were inoculated in which microalgae were inoculated into anaerobic-treated gelatine industry effluents, prepared with different dilutions and supplemented with Bolds basal médium (BBM). With the biomass concentrations quantified over time in each condition, nonlinear adjustments were made to the modified Gompertz model to obtain the maximum specific growth rates ($\mu_{\text{máx}}$). From the values of $\mu_{\text{máx}}$ and S, the Andrews substrate inhibition model ($R^2 = 0.872$) was proposed, determining the kinetic parameters $\mu_{\text{máx}}$, K_M and K_i by using *Origin 8.0* softwares and the optimal substrate concentration of photobioreactors operation ($S_{\text{opt}}=37.59\text{mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$). After microbial growth kinetics and microalgae tolerance to ammonia nitrogen were defined, the 1.0 L batch column bubble photobioreactors (PBRs) were started, specific growth rates of 0.343 d^{-1} , biomass productivity of $0.141\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, lipid yield of $17.63\text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, and ammonia nitrogen and nitrate removal efficiencies of 98.85% and 35.48%, were reached respectively. The results show the potential of *C.vulgaris* microalgae to integrate wastewater post treatment with lipid production.

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Microbial kinetics. Photobioreactors. Gelatine industry. Nitrogen removal. Lipid production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio pela célula das microalgas	31
Figura 2: <i>Chlorella vulgaris</i>	32
Figura 3: Diferentes fases da formação da parede celular em microalgas da espécie <i>Chlorella vulgaris</i>	32
Figura 4: Diferentes configurações de fotobiorreatores de coluna vertical.....	35
Figura 5: Processo de produção da gelatina	40
Figura 6: Desenho experimental do projeto	42
Figura 7: Inóculo repicado em erlenmeyer de 250 mL (à esquerda) e células de <i>C.vulgaris</i> aproximadas (à direita)	43
Figura 8: Esquema dos fotobiorreatores (PBRs) utilizados para cultivo	49
Figura 9: Fotobiorreatores coluna de bolhas utilizados no cultivo, operando no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (FZEA/USP).....	50
Figura 10: Meio de cultivo antes (à esquerda) e após a adição da solução flocculante de sulfato de alumínio (à direita).....	52
Figura 11: Sistema de filtração (à esquerda) e biomassa úmida (à direita).....	52
Figura 12: Biomassa seca e moída	53
Figura 13: Sistema de hidratação da biomassa (banho de ultrassom)	54
Figura 14: Sistema de separação de fases.....	55
Figura 15: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo no controle negativo (BBM).....	57
Figura 16: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo na condição C ₁	58
Figura 17: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo na condição C ₂	58
Figura 18: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo na condição C ₃	59
Figura 19: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo na condição C ₄	59
Figura 20: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo na condição C ₅	60

Figura 21: Velocidade específica de crescimento máxima em função da concentração de substrato inibitório (Modelo cinético de Andrews).	61
Figura 22: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> em função do tempo nos fotobiorreatores coluna de bolhas com água residuária	64
Figura 23: Perfil de crescimento das microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> nos fotobiorreatores coluna de bolhas com meio artificial Bold Basal modificado (Controle)	64
Figura 24: Ajuste do consumo de nitrogênio amoniacal nos fotobiorreatores ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem	69
Figura 25: Ajuste do consumo de nitrato nos fotobiorreatores ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem	69
Figura 26: Ajustes em série ao modelo de decaimento de 1º ordem para as duas fases de consumo de nitrogênio amoniacal.....	72
Figura 27: Curva de calibração da biomassa.	85
Figura 28: Teste de normalidade para os dados dos fotobiorreatores (PBRs) com água residuária suplementada.....	85
Figura 29: Teste de normalidade para os dados dos fotobiorreatores (PBRs) com meio basal (controle).....	86
Figura 30: Teste de igualdade de variâncias entre as condições testadas nos fotobiorreatores (PBRs).....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Velocidades específicas de crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i> em meios com diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal	33
Tabela 2: Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas	37
Tabela 3: Meio Bold Basal modificado (BBM)	43
Tabela 4: Caracterização da água residuária agroindustrial tratada por via anaeróbia em reator do tipo UASB	44
Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos através dos ajustes não lineares (modelo cinético de Gompertz-modificado).	60
Tabela 6: Parâmetros cinéticos dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) obtidos através dos ajustes não lineares (Gompertz-modificado).	65
Tabela 7: Produtividade de biomassa (P_B) dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs).	67
Tabela 8: Análise de variância da produtividade de biomassa dos fotobiorreatores (PBRs) ...	68
Tabela 9: Parâmetros cinéticos obtidos no ajuste ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem no fotobiorreator (S_{opt}).....	70
Tabela 10: Parâmetros cinéticos de consumo de nitrogênio amoniacal das fases 1 e 2.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

abs	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
BBM	Bold Basal Medium
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga
PBR	Fotobiorreator
PBRs	Fotobiorreatores
Rpm	Rotações por minuto
TAGs	Triacilgliceróis
UASB	<i>Upflow anaerobic sludge blanket reactor</i>
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica de crescimento máxima
μ_X	Velocidade específica de crescimento
AmT	Canal de transporte de amônia
C	Assíntota de ln de X/Xo no tempo t
C ₁	Condição 1
C ₂	Condição 2
C ₃	Condição 3
C ₄	Condição 4
C ₅	Condição 5
C ₆	Condição 6
Ca	Calcio
Co	Cobalto
CO ₂	Gás carbônico
Cu	Cobre
DQO	Demanda química de oxigênio
DUR3	Canal de transporte de ureia
ER	Eficiência de remoção
Fe	Ferro
F _M	Fração mássica de lipídios
GS-GOGAT	Síntese glutamina/glutamato.
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HS ⁻	Hidrogenossulfeto
HANT	Sistema de transporte de nitrato de alta afinidade
k	Constante de velocidade de primeira ordem
K _i	Constante de inibição
K _s	Constante de saturação

Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MnCl ₂	Cloreto de manganês
N-Amoniacal	Nitrogênio amoniacal
Ni	Níquel
N-NH ₃	Amônia livre
N-NH ₄ ⁺	Amônio
N-NO ₂ ⁻	Nitrito
N-NO ₃ ⁻	Nitrato
N _{ORG}	Nitrogênio orgânico
Nrt2/Nar2	Sistemas de transporte de nitratos e nitritos
N _T	Nitrogênio total
NTK	Nitrogênio total Kjeldahl
OD	Oxigênio dissolvido
P _B	Produtividade de biomassa
P _L	Produtividade de lipídios
P _T	Fósforo total
R ²	Coefficiente de correlação
r _s	Velocidade instantânea de consumo de substrato
S	Concentração de substrato
S _f	Concentração final de substrato
S _o	Concentração inicial de substrato
SO ₄ ²⁻	Sulfato
S _{opt}	Concentração de substrato ótima de operação
TAGs	Triacilgliceróis
X	Concentração de biomassa
X _F	Concentração final de biomassa

X_0	Concentração inicial de biomassa
Y	Concentração de biomassa no tempo t
Z_n	Zinco
λ	Fase lag

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	47
Equação 2	48
Equação 3	48
Equação 4	51
Equação 5	51
Equação 6	51
Equação 7	55
Equação 8	55
Equação 9	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Objetivo geral.....	29
1.2 Objetivos específicos.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 Microalgas	30
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	32
2.2 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores	34
2.3 Síntese de lipídios.....	36
2.4 Águas residuárias de gelatina tratadas por via anaeróbia	39
3 MATERIAS E METODOS	42
3.1 Desenho Experimental	42
3.2 Inóculo	43
3.3 Água residuária da Indústria GELITA do Brasil Ltda	44
3.3.1 Caracterização físico-química	44
3.3.2 Ajuste do pH.....	44
3.3.3 Filtração	45
3.3.4 Esterilização.....	45
3.4 Curva de calibração da biomassa	45
3.5 Adaptação do inóculo à água residuária	45
3.6 Ensaio cinético de crescimento microbiano.....	46
3.6.1 Modelos cinéticos ajustados aos ensaios de crescimento microbiano.....	47
3.7 Fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs).....	48
3.7.1 Monitoramento dos cultivos	50
3.7.2 Modelos cinéticos de crescimento e consumo de substrato	51
3.7.3 Eficiência de remoção de nitrogênio	51
3.7.4 Colheita da biomassa	52
3.7.4.1 Filtração da biomassa	52
3.7.4.2 Pré tratamento da biomassa (secagem e trituração).....	53
3.7.5 Método de extração de lipídios.....	53
3.7.5.1 Hidratação da biomassa e quebra da parede celular	53
3.7.5.2 Extração dos lipídios	54
3.7.6 Produtividade de biomassa e lipídios	55

3.7.7 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Parâmetros cinéticos de crescimento microbiano	57
4.2 Fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs)	63
4.2.1 Modelagem cinética do crescimento microbiano.....	63
4.2.2 Análise estatística da produtividade de biomassa	67
4.2.3 Modelagem cinética do consumo de nitrogênio	68
4.2.4 Eficiência de remoção de nitrogênio.....	73
4.2.5 Teor de lipídios totais e produtividade lipídica.....	74
5 CONCLUSÃO	76
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, no Brasil, um dos principais impactos causados por conta do aumento da demanda e do consumo excessivo e desordenado dos recursos naturais é a contaminação dos corpos hídricos. A água é um recurso renovável ainda presente em grande quantidade no planeta, com uma ampla variedade de aplicações, fácil obtenção e custo consideravelmente baixo, todavia, apesar da abundância, esse recurso natural deve ser utilizado de maneira consciente para que seja garantida sua preservação e os seus usos múltiplos (DHOTE; INGOLE; CHAVHAN, 2012).

Em resposta à necessidade global de realizar um desenvolvimento mais sustentável, as tecnologias de tratamento evoluíram consideravelmente, podendo-se dizer que qualquer água pode ser tratada e destinada ao consumo, ainda que os custos e riscos envolvidos possam ser extremamente elevados (SIKOSANA et al., 2019). Na maioria dos casos, tanto o material orgânico solúvel quanto o insolúvel, podem ser removidos com eficácia através da ação biológica, caso seja fornecido um ambiente favorável aos microrganismos vivos. Porém, para dimensionar qualquer processo de tratamento biológico de águas residuárias, é necessário que se tenha compreensão básica dos fatores ambientais que afetam o metabolismo microbiano, das necessidades nutricionais dos microrganismos, e da relação entre crescimento microbiano e utilização de substrato (RITTMANN; MCCARTY, 2000).

Os métodos convencionais anaeróbios voltados à remoção do material carbonáceo não se mostram eficazes quanto à remoção de nutrientes, portanto em muitos casos existe a necessidade da instalação de unidades de pós tratamento (LI; YU, 2016; MAI; KUNACHEVA; STUCKEY, 2018; PALATSI et al., 2011). Nesse contexto, o cultivo de microalgas têm se mostrado como uma alternativa ao tratamento terciário, pois, além da capacidade de absorção de nutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes nos meios aquáticos, as mesmas acumulam lipídios, produzem oxigênio e capturam o gás carbônico presente na atmosfera (DE MENDONÇA et al., 2018). Os rendimentos destes produtos variam conforme a espécie e podem ser melhorados por meio da indução de perturbações, resultando em estresse, bem como por meio da adaptação de certas estratégias de cultivo (ANSARI et al., 2017).

Microalgas geralmente são cultivadas em sistemas fechados (fotobiorreatores) ou sistemas abertos (lagoas fotossintéticas) (WANG; LAN; HORSMAN, 2012). Um dos principais desafios na aplicação dessa biotecnologia é o dimensionamento de fotobiorreatores que sejam economicamente viáveis e que possibilitem os cultivos em larga escala. O alto custo para a construção e operação de fotobiorreatores aliado a necessidade de grandes quantidades

de nutrientes limitam a utilização comercial, portanto, visando à redução dos custos, utilizar efluentes como fonte de água e nutrientes para o cultivo tem se mostrado uma alternativa promissora (MOBIN; ALAM, 2017).

Os efluentes gerados pela indústria de alimentos e atividades agrícolas tem mostrado potencial de reutilização por serem uma grande fonte de poluição ambiental e apresentarem elevadas cargas de compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos, altas demandas químicas e bioquímicas de oxigênio além de quantidades substanciais de gorduras, carboidratos e proteínas. Cada tipo de água residual gerada no processamento de alimentos terá fatores específicos a serem considerados na escolha da tecnologia de tratamento empregado (FALLETTI et al., 2015; JANOSZ RAJCZYK, 1993). Nesse sentido, o trabalho busca avaliar por meio da quantificação da eficiência de remoção de compostos nitrogenados, da produtividade de lipídios, e pela inferência dos parâmetros cinéticos voltados ao estudo do crescimento microbiano, a viabilidade do cultivo de microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* como tecnologia alternativa de pós tratamento de efluentes agroindustriais.

1.1 Objetivo geral

Integrar o pós-tratamento de águas residuárias à produção de lipídios através do cultivo de microalgas da espécie *C.vulgaris*.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros cinéticos do crescimento microbiano da microalga *Chlorella vulgaris* na água residuária digerida por via anaeróbia.
- Avaliar a inibição do crescimento celular pelo excesso de nitrogênio amoniacal presente na água residuária.
- Quantificar a eficiência de remoção de compostos nitrogenados e a produtividade de biomassa e lipídios dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalgas

As algas constituem um grupo de organismos clorofilados, com hábitos aquáticos fotossintetizantes e talófitos (OLAIZOLA, 2003). A fotossíntese é a principal rota de conversão realizada por esse grupo, que utiliza água, dióxido de carbono e luz na produção de oxigênio, energia e biomassa. A energia gerada é armazenada na forma de lipídios, carboidratos e proteínas (BANERJEE; DUBEY; SHUKLA, 2016; DEMIRBAS, 2011), podendo algumas espécies apresentar elevados teores de lipídios em sua composição (CAI; PARK; LI, 2013). Esses microrganismos possuem o crescimento influenciado pelas condições do meio, tais como a temperatura e a concentração de nutrientes disponíveis, conseqüentemente, quando ocorrem variações bruscas nos ecossistemas, o crescimento passa a ser desordenado provocando impactos ambientais, como a eutrofização (EZE et al., 2018).

Algas são classificadas de acordo com a morfologia, em microalgas e macroalgas. Microalgas, são unicelulares, com dimensões microscópicas; enquanto que as macroalgas são algas que apresentam múltiplas células e dimensões macroscópicas (LOURENÇO, 2006). As microalgas em sua maioria são microrganismos fotoautotróficos, ou seja, utilizam a luz solar como fonte energética e CO₂ presente na atmosfera como fonte de carbono, porém algumas espécies são mixotróficas, o que significa que atuam simultaneamente por meio de autotrofismo e heterotrofismo, consumindo tanto o carbono inorgânico (CO₂) como o carbono orgânico contido no meio (MELO et al., 2018a; SUN et al., 2008). O mecanismo mixotrófico cria um efeito aditivo e sinérgico que aumenta a produtividade de biomassa e a capacidade de diminuir a carga orgânica das águas residuárias (BHATNAGAR et al., 2011).

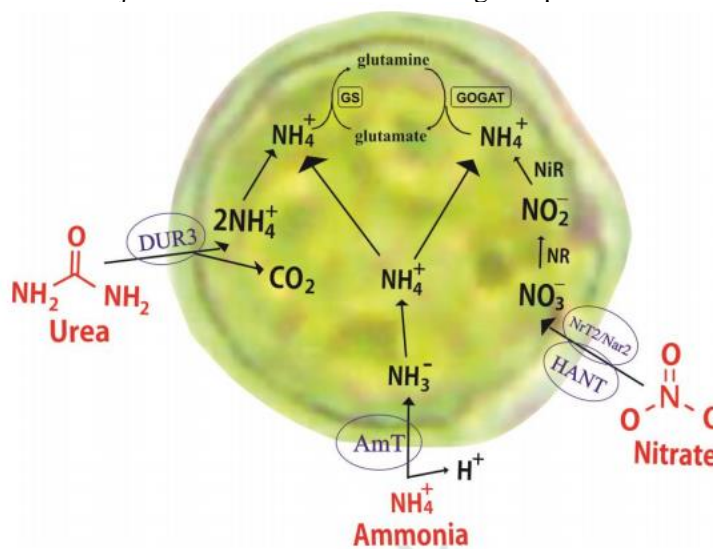
Cada espécie de microalga responde de maneira diferente durante o crescimento, e essas diferenças podem ser compreendidas por meio do exame de características específicas dos organismos. A análise das respostas das espécies geralmente necessita da realização de experimentos controlados, em que, na maioria dos casos, cada espécie estudada deve ser separada das demais. Tais experimentos originam-se em cultivos de microalgas. Recebem essa definição de cultivo, populações de organismos com a capacidade de sobreviver em condições artificiais e controladas de desenvolvimento (BANERJEE; DUBEY; SHUKLA, 2016; WANG et al., 2018).

Apesar do baixo teor na composição da biomassa microalgal, na faixa de 1% a 10%, o nitrogênio, utilizado na regulação das vias metabólicas, é o nutriente mais crítico para o crescimento das microalgas após o carbono (RICHMOND; HU, 2013). Algumas algas assimilam nitrogênio inorgânico em diferentes formas como nitrato (N-NO₃⁻), nitrito (N-NO₂⁻) e nitrogênio

amoniaco (N-Amoniaco) (Figura 1). Durante o processo de assimilação, os compostos nitrogenados inorgânicos passam através da membrana citoplasmática onde ocorrem reduções enzimáticas para formação de amônio, que é posteriormente convertido a compostos orgânicos, como os peptídeos, os aminoácidos, as proteínas, as enzimas e os ácidos nucleicos, necessários para o crescimento da biomassa (ABDELAZIZ; LEITE; HALLENBECK, 2013).

A assimilação do nitrogênio amoniaco requer menos energia, sendo a fonte de nitrogênio preferida das microalgas (MAESTRINI et al., 1986). Segundo Li et al. (2019), se nitrogênio amoniaco, nitrato ou nitrito estiverem presentes no meio de cultura, as microalgas irão consumir primeiramente o nitrogênio amoniaco em seguida o nitrito e por fim o nitrato. Entretanto, o excesso de nitrogênio amoniaco no meio de cultura apresenta aspectos negativos como a volatilização e a inibição do crescimento microbiano, dessa forma, o nitrato por ser quimicamente estável em ambientes aquáticos, é a forma mais utilizada para o cultivo de microalgas (FLORENCIO; VEGA, 1983).

Figura 1: Processo de assimilação de diferentes fontes de nitrogênio pela célula das microalgas



Legenda: AmT - Canal de transporte de amônia; Nrt2/Nar2 – Sistemas de transporte de nitratos e nitritos; HANT – Sistema de transporte de nitrato de alta afinidade; DUR3 – Canal de transporte de uréia; GS-GOGAT – Síntese glutamina/glutamato.

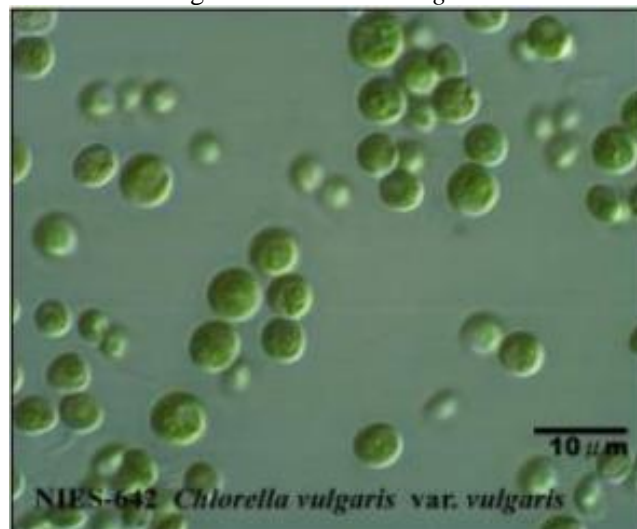
Fonte: Ribeiro et al. (2019).

Outro elemento importante para o crescimento das microalgas é o enxofre. A principal forma de enxofre disponível na natureza está na forma de sulfato, que é um nutriente essencial para a biossíntese de moléculas e constituintes celulares. Segundo Mera, Torres e Abalde (2016), que modelaram e avaliaram a cinética de crescimento das microalgas *Chlamydomonas moewusii* em função da concentração de sulfato de sódio, a concentração ótima desse substrato no meio de cultura é 426 mg.L⁻¹ sendo que em concentrações na faixa de 710 mg.L⁻¹ é observada inibição do crescimento celular.

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

A microalga *Chlorella vulgaris* pertence ao domínio Eukaryota, à divisão Chlorophyta, à classe Chlorophyceae, à família Chlorellaceae, e ao gênero *Chlorella*. É uma espécie de água doce com células microscópicas esféricas com 2-10 µm de diâmetro, compostas por 5% - 58% de lipídios, 42% - 58% de proteínas, 12% - 55% de carboidratos e 1% - 2% de pigmentos (CHISTI, 2007; SAFI et al., 2014). A Figura 2 apresenta a célula da *Chlorella vulgaris*.

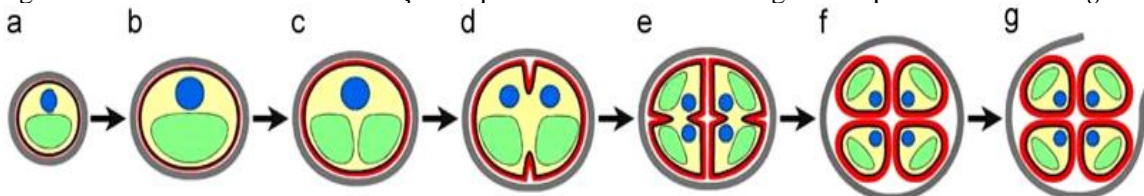
Figura 2 - *Chlorella vulgaris*



Fonte: Lúcio (2014).

A reprodução dessa espécie ocorre de forma assexuada, onde quatro células-filhas com sua própria parede celular são formadas dentro da parede celular da célula-mãe (Figura 3). Após a maturação dessas células, ocorre o rompimento da parede celular da célula-mãe permitindo a liberação das novas células, os restos remanescentes da célula-mãe serão consumidos como alimento pelas células recém-formadas (SAFI et al., 2014).

Figura 3 - Diferentes fases da formação da parede celular em microalgas da espécie *Chlorella vulgaris*.



Legenda: (a) fase de crescimento celular precoce; (b) fase tardia de crescimento celular; (c) fase de divisão dos cloroplastos; (d) fase de divisão inicial dos protoplastos; (e) fase tardia de divisão dos protoplastos; (f) fase de maturação das células filhas e (g) fase eclusão.

Fonte: Safi et al. (2014).

O excesso de nitrogênio amoniacal no meio provoca inibição na captação de nitrato e no crescimento das microalgas, entretanto a *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae), é uma alga particularmente tolerante a esse substrato (PRZYTOCKA-JUSIAK et al., 1977; TAM; WONG,

1996). Tam e Wong (1996), fizeram ensaios para quantificar a velocidade específica de crescimento da *C.vulgaris* em meios de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal, e observaram que o crescimento dessa espécie apresentou maior velocidade específica em meios com concentrações de 250 mgN-NH₄.L⁻¹, e que houve inibição do crescimento celular no meio de cultura com 500 mgN-NH₄.L⁻¹.

É importante ressaltar que além da espécie, a tolerância da microalga ao substrato dependerá das condições em que o cultivo foi realizado (LI et al., 2019). Para *Chlorella vulgaris*, as velocidades específicas de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) em cada concentração de substrato são apresentadas na Tabela 1, na qual é possível verificar a tolerância ao nitrogênio amoniacal e o potencial dessa espécie em aliar a remoção de nutrientes a produção de biomassa. Além disso, esses microrganismos alcançam altas produtividades lipídicas e são notavelmente resistentes a condições adversas e a contaminação (KIM et al., 2010; LAM et al., 2017; MARJAKANGAS et al., 2015).

Tabela 1 - Velocidades específicas de crescimento da *Chlorella vulgaris* em meios com diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal

NH ₄ -N (mg.L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹) ^a	R ²	Contagem máxima (x10 ⁶ células mL ⁻¹) ^b	Contagem final (x10 ⁶ células mL ⁻¹) ^c
0	0,054a	0,87	3,16 (dia 14)	2,64
10	0,204b	0,90	22,59 (dia 21)	22,59
20	0,228c	0,89	54,48 (dia 18)	53,46
40	0,214c	0,97	49,55 (dia 17)	44,70
50	0,212c	0,98	50,69 (dia 18)	50,18
60	0,211c	0,96	46,85 (dia 18)	32,50
80	0,219c	0,97	49,30 (dia 17)	44,70
125	0,213c	0,95	50,30 (dia 21)	50,30
250	0,236c	0,99	50,39 (dia 21)	50,39
500	0,221c	0,97	37,75 (dia 21)	37,75
750	0,204b	0,99	44,89 (dia 21)	44,89
1000	0,199b	0,99	38,30 (dia 18)	29,18
Bristol medium	0,229c	0,96	67,85 (dia 17)	13,19

Legenda: R² – Coeficiente de correlação; a – Valores seguidos por letras diferentes indicam que eles foram significativamente diferentes a um nível de probabilidade de 0,05 de acordo com o teste ANOVA; b – Os valores entre colchetes são as datas de cultivo que mostram a contagem máxima de células; c – A densidade celular inicial foi de 1 x 10⁶ células.mL⁻¹.

Fonte: Tam e Wong (1996).

Feng, Li e Zhang (2011) cultivaram *C. vulgaris* em fotobiorreatores do tipo coluna de bolha alimentados com águas residuárias artificiais simulando esgoto doméstico, operados em batelada por 14 dias, alcançando teor de lipídios totais de 42% e produtividade lipídica de 147 mg.L⁻¹.d⁻¹, além de eficiência de remoção de matéria orgânica expressa em demanda química

de oxigênio (DQO) de 86%, e de nutrientes de 97% e 96% para nitrogênio amoniacal e fósforo total, respectivamente.

Melo et al. (2018) cultivou *C.vulgaris* em batealada por 14 dias, sob condições autotróficas e mixotróficas, utilizando erlenmeyers de 1,0 L contendo efluentes agroindustriais (MELO et al., 2018). Nesse estudo o $N-NO_3^-$ foi 100% removido em todas as condições de crescimento pelo fato dos substratos utilizados terem baixa carga de amônia e nitrito, conseqüentemente a microalga consumiu todo o $N-NO_3^-$. O nitrogênio orgânico atingiu eficiências de remoção entre 50 e 100%

Altas taxas de remoção de nutrientes e produção de biomassa foram obtidas também por Caporgno et al. (2015) cultivando microalgas de água doce da espécie *Chlorella kessleri* e *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores com águas residuárias urbanas. Os cultivos de *Chlorella kessleri* alcançaram uma produção máxima de biomassa microalgal de $2,70 \text{ g.L}^{-1}$ e uma remoção de 96% do nitrogênio total presente no efluente, enquanto os cultivos de *Chlorella vulgaris* alcançaram uma produção máxima de biomassa de $2,91 \text{ g.L}^{-1}$ e uma remoção de nitrogênio total de 95%.

2.2 Cultivo de microalgas em fotobiorreatores

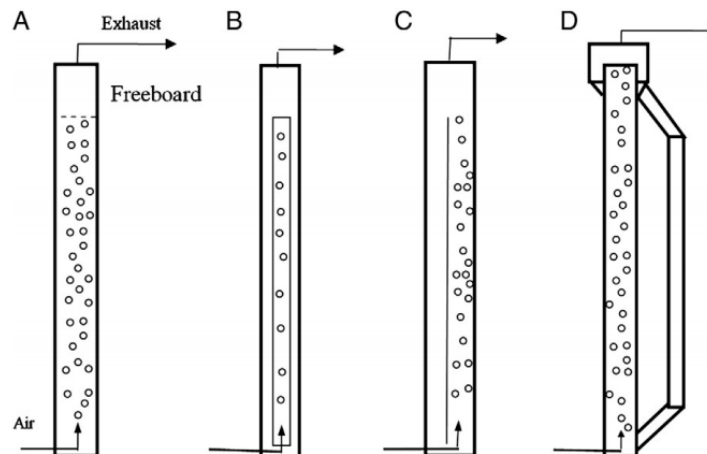
Atualmente, por conta do baixo custo de operação e de capital, a maioria dos processos industriais de cultivo de microalgas são feitos em sistemas abertos como as lagoas fotossintéticas (WANG; LAN; HORSMAN, 2012). No entanto, os sistemas abertos de cultivo apresentam diversas desvantagens em comparação aos fotobiorreatores, devido à falta de controle das condições operacionais, que limita o crescimento das microalgas à superfície das lagoas e resulta em baixas produtividades volumétricas de biomassa e baixas densidades celulares (SUH; LEE, 2003).

Uma grande variedade de fotobiorreatores (PBRs – do inglês, photobiorreactors) tem sido desenvolvida nas últimas décadas, sendo tais equipamentos classificados de acordo com a sua geometria em: coluna vertical, tubular, e PBRs de tela plana. Os fotobiorreatores de coluna vertical são geralmente constituídos por cilindros com raios de até 0,2 m e alturas de até 4,0 m (WANG; LAN; HORSMAN, 2012). Esse tipo de reator deve ser projetado com raios pequenos, para que a relação superfície-volume seja aumentada proporcionando ao sistema uma eficiente distribuição da luminosidade, e com restrições de altura, para garantir transferências de gases efetivas e segurança operacional devido à resistência dos materiais transparentes utilizados na construção das colunas (KHOO; LAM; LEE, 2016). Em colunas muito altas por exemplo,

podem ser estabelecidos gradientes de gás carbônico, reduzindo a disponibilidade dos gases e criando gradientes de pH (VALDÉS et al., 2012; XU et al., 2009). Além disso, o aumento do comprimento da coluna aumenta o tempo de residência do oxigênio dissolvido (OD) produzido pela fotossíntese no reator, podendo ser alcançadas concentrações elevadas que inibem o crescimento microbiano (KAZBAR et al., 2019).

Os PBRs de coluna vertical são caracterizados por seus altos coeficientes volumétricos de transferência de gás. O borbulhar dos gases na parte inferior da coluna proporciona a utilização eficiente do gás carbônico e a remoção efetiva do oxigênio dissolvido (SEO et al., 2012). A agitação constante do meio causada pelas bolhas de gás mistura a cultura suavemente com baixas tensões de cisalhamento em comparação aos impulsores e as bombas (LÓPEZ-ROSALES et al., 2019). Dessa forma, o dano celular associado aos PBRs de coluna vertical é muito baixo, exceto em vazões extremas de gases superficiais (VEGA-ESTRADA et al., 2005). Portanto, nesse tipo de fotobiorreator o crescimento das microalgas é normalmente limitado por outras variáveis, como a intensidade de luz e a disponibilidade de nutrientes. A estrutura dos diferentes tipos de PBRs de coluna vertical é apresentada na Figura 4 abaixo.

.Figura 4: Diferentes configurações de fotobiorreatores de coluna vertical



Legenda: a) PBR coluna de bolhas; b) PBR airlift; c) PBR de coluna dividida; d) PBR de malha externa.

Fonte: Wang, Lan e Horsman (2012)

Conforme apresentado na Figura 4A, um PBR do tipo coluna de bolhas é composto por uma coluna com aspersor de ar localizado na parte inferior do biorreator, onde as bolhas preenchem todo o volume útil do sistema. A mistura do meio de cultura é feita pela turbulência e pelo fluxo ascendente (*upflow*) das bolhas de ar introduzidas, enquanto o *headspace* deixado

no topo do PBR é projetado para promover a desgaseificação (separação gás/líquido) (BARAHOEI; HATAMIPOUR; AFSHARZADEH, 2020; SÁNCHEZ MIRÓN et al., 2002).

2.3 Síntese de lipídios

Microalgas convertem a energia solar em energia química, a qual é acumulada na forma de lipídios, carboidratos e proteínas (DEMIRBAS, 2011). Os lipídios armazenados podem ser extraídos e transesterificados produzindo o biodiesel, enquanto a biomassa restante após a extração pode ser usada na hidrólise dos carboidratos para obtenção de açúcares fermentáveis que serão utilizados na síntese do bioetanol (BAICHA et al., 2016; CHISTI, 2007). O biodiesel apresenta múltiplas vantagens sobre o diesel de origem fóssil, tais como: elevado ponto de fulgor, alta lubrificidade e elevada biodegradabilidade, podendo ser utilizado nos motores a diesel convencionais sem qualquer modificação (CHEN et al., 2015). Além disso, os gases emitidos na combustão podem ser absorvidos pelas microalgas para realização da fotossíntese (ADENIYI; AZIMOV; BURLUKA, 2018; KHAN et al., 2017).

Os lipídios produzidos pelas microalgas são divididos em dois grupos principais: lipídios polares (hidrofílicos), como os glicerofosfolípidios, e lipídios não polares (hidrofóbicos), como os triacilgliceróis (TAGs) (ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Os lipídios polares geralmente têm longas cadeias de ácidos graxos e uma barreira seletiva permeável que auxilia na separação das organelas intracelulares, enquanto os TAGs possuem cadeias hidrocarbonadas e são responsáveis pelo armazenamento de energia (DHARANI; RAMAMURTHY, 2014). Segundo Sharma, Schuhman e Schenk (2012) as células de microalgas são constituídas por ácidos graxos saturados e monoinsaturados.

A síntese de lipídios por via microbiana voltada a produção de energia já é conhecida há algum tempo, os estudos têm se intensificado nos últimos anos por conta da necessidade global de promover o desenvolvimento sustentável e encontrar fontes de energia renováveis. O viés energético é apenas uma das aplicações desse processo, a biotecnologia de lipídios pode ser utilizada também para outros usos industriais, como interesterificação e obtenção de esteróis (BAICHA et al., 2016). Os lipídios podem ser sintetizados por microrganismos, sejam procariotos (algas azuis/cianobactérias) ou eucariotos (algas verdes/clorófitas) (KHAN et al., 2017), sendo que tanto o conteúdo quanto a composição dessas substâncias serão de extrema importância para a determinação da qualidade de uma biomassa microbiana (NAGARAJAN et al., 2013). O conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Conteúdo lipídico de diferentes espécies de microalgas

Microalgas marinhas e de água doce	Conteúdo em Lipídios (% biomassa peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25,0 – 75,0
<i>Chlorella emersonii</i>	25,0 – 63,0
<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6 – 57,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0 – 58,0
<i>Chlorella minutíssima</i>	10,0 – 57,0
<i>Clorococcum sp.</i>	19,3 – 53,7
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20,0 – 51,1
<i>Dunaliella salina</i>	6,0 – 25,0
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7 – 71,0
<i>Dunaliella sp.</i>	17,5 – 67,0
<i>Euglena gracilis</i>	14,0 – 20,0
<i>Isochrysis galbana</i>	7,0 – 40,0
<i>Monallanthus salina</i>	20,0 – 22,0
<i>Nannochloris sp.</i>	20,0 – 56,0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7 – 29,7
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	12,3 – 20,5
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0 – 65,0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0 – 57,0
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1,9 – 18,4

Fonte: Chisti (2007).

A diferença na biossíntese de lipídios realizada pelas microalgas ocorre não apenas entre organismos taxonomicamente diferentes, mas também entre grupos que compartilham semelhanças de uma mesma espécie. Dessa forma, as condições adequadas de cultivos, como a configuração do biorreator, o fotoperíodo e a concentração de nutrientes do meio, aparentam-se como mais importantes que as espécies a qual pertencem os microrganismos (YU et al., 2017), portanto, estratégias de cultivos podem ser adotadas visando aumento na produtividade lipídica, como, por exemplo, variando a temperatura, selecionando comprimentos de ondas específicos, aumentando a intensidade luminosa, adicionando metais pesados e reduzindo a disponibilidade de nutrientes (FERREIRA et al., 2019; JIANG; YOSHIDA; QUIGG, 2012; MENEGAZZO; FONSECA, 2019; PARK; NGUYEN; JIN, 2019).

Algumas pesquisas sugerem que, conforme a temperatura do meio reacional aumenta, as microalgas tendem a produzir e acumular ácidos graxos saturados, enquanto, conforme as temperaturas diminuem, as microalgas tendem a produzir e acumular ácidos graxos insaturados

(ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Converti et al. (2009) avaliaram o efeito da temperatura na produção lipídica de microalgas da espécie *C.vulgaris* e *N.oculata*. Durante o cultivo de *N.oculata*, foi verificado que a elevação da temperatura resultou em aumento do conteúdo lipídico, enquanto a redução da temperatura resultou em diminuição do conteúdo lipídico acumulado. Porém, no mesmo trabalho, foi observado o comportamento inverso no cultivo de *C.vulgaris*, onde a elevação da temperatura proporcionou diminuição no conteúdo lipídico, enquanto a redução da temperatura proporcionou aumento do conteúdo lipídico celular. Portanto, a temperatura ideal varia conforme a espécie de microalga, podendo ser selecionada de acordo com o objetivo do trabalho (CONVERTI et al., 2009).

No caso da luz, o comprimento de onda e a intensidade luminosa podem causar também mudanças significativas no crescimento e na produção de lipídios das microalgas (ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Nadzir et al. (2018) promoveram o “stress” físico das células cultivando *T.obliquus* em diferentes faixas de intensidade luminosa (4000 – 30000 lux) para avaliar o efeito da intensidade da luz na produtividade lipídica das microalgas. A maior produtividade lipídica obtida foi na faixa de 23500 lux, sendo alcançadas produtividades de 27 mg.L⁻¹.d⁻¹ e um teor lipídico de 23%. Segundo Wu, Yu e Hu (2014), o teor de lipídios é diretamente proporcional à intensidade da luz, ou seja, elevadas intensidades luminosas proporcionam aumento no teor total de lipídios acumulados, porém, em condições onde os cultivos são expostos a intensidades luminosas muito elevadas, pode ocorrer a saturação e a consequente inibição do crescimento celular (fotoinibição). Wong et al. (2016) avaliaram o efeito dos comprimentos de onda no crescimento de *Chlorella vulgaris*. Nesses experimentos foram utilizadas diferentes lâmpadas de LED (branco, azul e vermelha), sendo observado que após 10 dias, com fotoperíodos de 18:6 (claro/escuro), as microalgas cultivadas com luz azul atingiram maiores teores de lipídios totais (34,06%) devido à eficiência e a penetração profunda do comprimento de onda selecionado (WONG et al., 2016).

Outro fator que afeta diretamente a produção de lipídios é a limitação/disponibilidade de nutrientes (ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Diversos estudos exploraram técnicas de limitação de nutrientes com diferentes espécies de microalgas para entender e otimizar a produção de ácidos graxos. Yang et al. (2018) mostraram que, em situações de deficiência de fósforo ou nitrogênio, o rendimento de ácidos graxos em *Chlamydomonas reinhardtii* aumenta significativamente. Em outro estudo feito por Cordeiro et al. (2017), que avaliaram o efeito dos níveis de fósforo e nitrogênio no crescimento de microalgas da espécie *Microcystis*, foi relatado que o acúmulo de lipídios apresentou correlação inversa com a concentração de nitrogênio

(35,8%) e direta com a concentração de fósforo (31,7 %). Esse fenômeno explica-se pelo fato de que a disponibilidade de substrato é uma etapa limitante no equilíbrio do crescimento e da produção de ácidos graxos, assim, as vias de síntese de biomassa e de ácidos graxos competem pelos mesmos substratos (TAN; LEE, 2016).

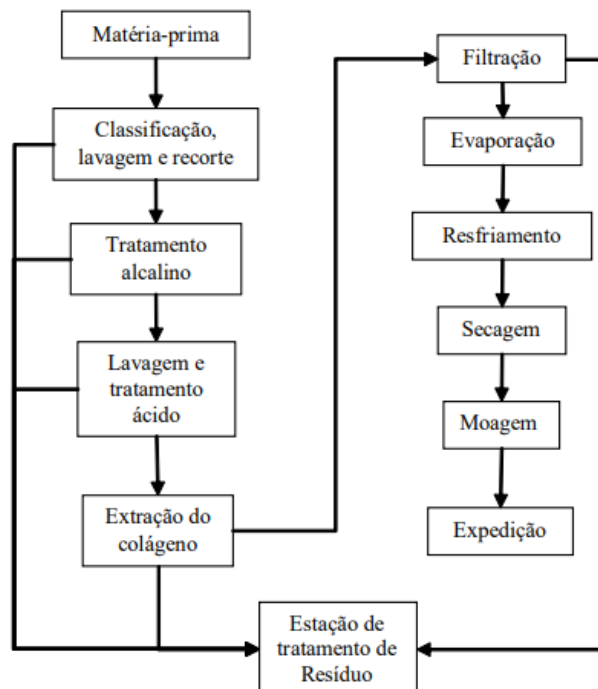
Além dos macronutrientes, alguns metais pesados, como Cu, Fe, Mn, Ni e Zn, são fundamentais nos processos biológicos e na produção de lipídios (KAR et al., 2008; NICOLAU; GALERA-CUNHA; LUCAS, 2006), atuando como precursores de vitaminas, cofatores enzimáticos e estruturando proteínas da membrana celular (MUNDA; HUDNIK, 1988). Ren et al. (2014) verificaram os efeitos de Fe^{3+} (0,0 - 0,12 g.L^{-1}), Mg^{2+} (0,0 - 0,73 g.L^{-1}) e Ca^{2+} (0,0 - 0,98 g.L^{-1}) na produção de lipídios de microalgas da espécie *Scenedesmus* sp. observando que o conteúdo lipídico total e a produtividade lipídica aumentaram até 28,2% e 29,7%, respectivamente, com a adição de EDTA durante o cultivo. Esse comportamento indica que, as principais vias metabólicas relacionadas à síntese e degradação lipídica da *Scenedesmus* sp. podem ser modificadas por Fe^{3+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} (LIU; WANG; ZHOU, 2008). Nos ensaios desenvolvidos por Liu, Wang e Zhou (2008) foi observado que, aumentando 10 vezes a concentração de ferro (em comparação com o meio de cultura padrão), a produtividade lipídica da microalga *C.vulgaris* aumentou de 14,6 $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para 28,0 $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Battah et al. (2015) também avaliaram o efeito dos metais pesados (Mn^{2+} e Co^{2+}) no conteúdo lipídico de *C.vulgaris*, usando cloreto de manganês (MnCl_2) em concentrações de 2 μM , 10 μM e 12 μM . Os resultados obtidos demonstraram que a elevação das concentrações de metais pesados no meio de cultura resultou em aumento de 14%, 16% e 15% no teor de lipídios totais, respectivamente.

2.4 Águas residuárias de gelatina tratadas por via anaeróbia

O Brasil é o maior produtor de gelatina do mundo, sendo que a empresa GELITA é a maior fabricante mundial de gelatina, com uma produção de 85 mil toneladas ao ano, das quais 20 mil são produzidas na planta do Brasil (RIBEIRO, 2007). No processo de produção da gelatina, a matéria-prima mais utilizada é o resíduo da indústria de couro denominado raspa de couro. Esse material passa por uma etapa de triagem sendo cortado em pequenos pedaços que são inteiramente lavados e tratados com solução alcalina de cal. Posteriormente, a raspa de couro é lavada com água corrente e submetida ao tratamento ácido com solução diluída de ácido sulfúrico (MARIOD; FADUL, 2013).

Após essas etapas, é feito o processo de extração do colágeno da matéria-prima, colocando as raspas de couro em grandes tanques de aço inoxidável e adicionando água quente. Nesse processo, é gerado uma solução diluída de gelatina que será filtrada em filtros de pressão e concentrada em evaporadores de triplo efeito, produzindo o caldo de gelatina concentrado. O caldo produzido é resfriado, sendo convertido a uma espécie de geleia, que é encaminhada para secadores, onde são feitas as etapas finais de secagem e moagem do material. Os resíduos gerados na triagem, no tratamento alcalino, na lavagem, no tratamento ácido e na filtração são encaminhados para a estação de tratamento de efluentes (MA et al., 2019). O fluxograma do processo produtivo da gelatina é ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Processo de produção da gelatina



Fonte: Ribeiro (2007)

Em função desses processos, os efluentes produzidos nesse tipo de indústria apresentam elevadas cargas de proteínas, sulfetos e nitrogênio orgânico. Efluentes desse tipo, quando tratados por reatores anaeróbios, originam águas residuárias com altas concentrações de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal), devido a degradação das proteínas presentes no material orgânico. Durante o processo de degradação do material proteico, as proteínas são hidrolisadas a peptídeos e posteriormente á aminoácidos que são rapidamente fermentados por bactérias acidogênicas fermentativas e convertidos em ácidos voláteis de cadeias curtas, dióxido de carbono e nitrogênio amoniacal (MCINERNEY, 1988).

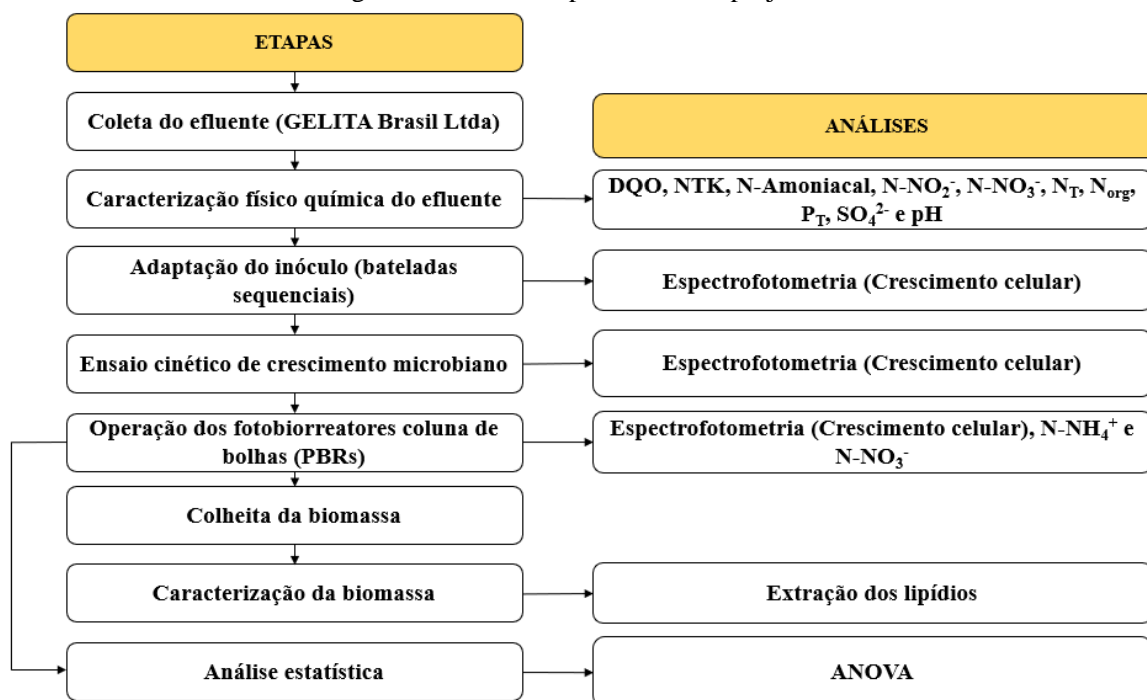
Ruiz et al. (1997) realizaram estudos sobre a digestão anaeróbia de água residuária com elevado teor proteico (70% do total de matéria orgânica) e elevada carga orgânica (aproximadamente 8000 mgDQO.L⁻¹) provenientes de abatedouro. Os ensaios foram realizados em dois tipos de reatores, um UASB e um filtro biológico. Nesse estudo, foram alcançadas eficiências de remoção de matéria orgânica de 75% e elevados teores de nitrogênio amoniacal (461 – 980 mg.L⁻¹) em ambos os reatores.

3 MATERIAS E METODOS

3.1 Desenho Experimental

Esse estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da FZEA/USP. A água residuária tratada em reator UASB foi coletada na indústria GELITA do Brasil Ltda, situada no município de Mococa/SP. O efluente coletado foi caracterizado físico-quimicamente, diluído, suplementado com meio basal e encaminhado para fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) operados em bateladas sequenciais, para promoção da adaptação da biomassa ao efluente. Posteriormente, com o inóculo adaptado foi realizado o ensaio cinético de crescimento microbiano, quando se determinou o modelo de crescimento e a concentração de substrato (N-Amoniacal) de operação dos PBRs. Em seguida, com os parâmetros cinéticos definidos ($\mu_{máx}$, K_s e K_i), os fotobiorreatores foram operados em batelada até que a produção de biomassa cessasse. A biomassa final acumulada foi colhida e caracterizada (lipídios). Por fim, com os resultados dos cultivos nos PBRs foram feitos ajustes aos modelos cinéticos de crescimento e de consumo de substrato e a análise estatística do processo. A Figura 6 ilustra as etapas e as análises do projeto.

Figura 6: Desenho experimental do projeto

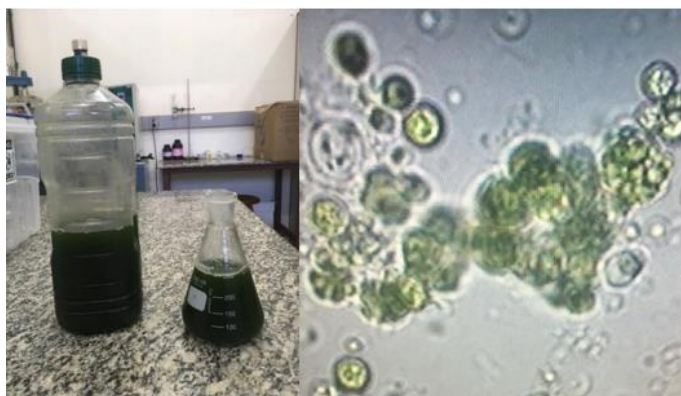


Fonte: Próprio autor.

3.2 Inóculo

O inóculo da microalga *Chlorella vulgaris* clone BMAK D1 foi fornecido pelo Prof. Dr. Messias Borges Silva do Laboratório de Engenharia de Microalgas da Escola de Engenharia de Lorena. A cultura foi mantida e propagada em condições assépticas, utilizando erlenmeyers de 250 mL, na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Ambiental (FZEA/USP) em meio BBM modificado (Tabela 3). Os inóculos foram mantidos em condições controladas de temperatura (26 ± 2 °C) e fotoperíodo (24/0 horas, claro/escuro) com intensidade luminosa estimada em 4,6 klux. A Figuras 7 ilustra o inóculo axênico repicado e as células aproximadas (63 vezes) em microscópio optico da marca LEICA modelo DMLB.

Figura 7: Inóculo repicado em erlenmeyer de 250 mL (à esquerda) e células de *C.vulgaris* aproximadas (à direita)



Fonte: Próprio autor.

Tabela 3: Meio Bold Basal modificado (BBM)

Parâmetro	Solução Estoque (g.L ⁻¹)	Alíquota (mL)	Concentração final (mg.L ⁻¹)
NaNO ₃	150	5	750
K ₂ HPO ₄	7,5	10	75
KH ₂ PO ₄	17,5	10	175
NaHCO ₃	7,5	10	75
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5	5	5
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	10	5	20
EDTA	25	2	50
FeCl ₃ .6H ₂ O	2	2	4
H ₃ BO ₃	2	2	4
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,75	2	1,5
Cl ₂ Mn.7H ₂ O	0,12	2	0,24
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,12	2	0,24
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,03	2	0,06
Na ₂ MoO ₄	0,10	2	0,20

Fonte: Lourenço (2006)

3.3 Água residuária da Indústria GELITA do Brasil Ltda

A água residuária utilizada nesse projeto foi proveniente do reator do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) da indústria GELITA do Brasil Ltda situada no município de Mococa/SP. A coleta ocorreu o mês de julho de 2019. A água residuária coletada foi armazenada em galões de 5,0 L e congeladas.

3.3.1 Caracterização físico-química

As análises de DQO bruta e filtrada, nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal), nitrito (N-NO₂⁻), nitrato (N-NO₃⁺), nitrogênio orgânico (N_{org}), nitrogênio total (N_T), fósforo total (P_T), e sulfatos (SO₄²⁻) foram realizadas conforme os métodos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005), enquanto a análise de oxigênio dissolvido (OD) foi feita utilizando sonda da marca SOP modelo YSI 55. A Tabela 4 apresenta a caracterização físico-química da água residuária.

Tabela 4: Caracterização da água residuária agroindustrial tratada por via anaeróbia em reator do tipo UASB

Parâmetro	Concentração
DQO _{Bruta} (mg.L ⁻¹)	170,65 ± 3,61
DQO _{Filtrada} (mg.L ⁻¹)	122,2 ± 5,66
OD (mg.L ⁻¹)	0,18 ± 0,05
NTK (mg.L ⁻¹)	359,98 ± 1,81
N-Amoniacal (mg.L ⁻¹)	281,90 ± 3,11
N-NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	0,22 ± 0,01
N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	10,44 ± 0,30
N _T (mg.L ⁻¹)	370,64 ± 2,13
N _{ORG} (mg.L ⁻¹)	78,08 ± 4,92
P _T (mg.L ⁻¹)	2,05 ± 0,06
SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)	521,91 ± 14,96
pH	7,75 ± 0,07

Fonte: Próprio autor.

3.3.2 Ajuste do pH

Visando o controle do deslocamento do equilíbrio químico da amônia livre (N-NH₃) ao íon amônio (N-NH₄⁺) e do sulfeto de hidrogênio (H₂S) a hidrogenossulfeto (HS⁻), o pH da água residuária foi ajustado em 7,5. O ajuste foi feito adicionando alíquotas de ácido sulfúrico diluído (0,05M), sendo quantificados os valores de pH por meio de pHmetro digital de bancada devidamente calibrado da marca Tecnal modelo TEC-03MP.

3.3.3 Filtração

Para evitar que a passagem da luz fosse bloqueada, por conta da alta concentração de sólidos e turbidez da água residuária, antes da inoculação o efluente foi filtrado em sistema de filtração composto por kitassato e funil de porcelana de Buncher com papel de filtro 0,45 μm .

3.3.4 Esterilização

Após a filtração da água residuária, procedeu-se a fase de esterilização, onde foi adicionado 1,0 mL.L^{-1} de hipoclorito de sódio (5%). A solução foi homogeneizada manualmente com bastão de vidro, sendo deixada em repouso 12 horas para que ocorresse a completa eliminação dos microrganismos (controle de espécies) e a oxidação irreversível dos sulfetos. Após esse período, foi feito teste utilizando indicador, para verificar a ausência de cloro na solução. Em casos onde foi observada a presença de cloro residual a solução foi neutralizada com tiosulfato de sódio.

3.4 Curva de calibração da biomassa

O monitoramento do crescimento das microalgas foi feito a partir da curva de calibração, elaborada para converter os resultados de absorbância (abs) em concentração de biomassa (g.L^{-1}). O comprimento de onda utilizado nas leituras em cubeta de quartzo foi de 680nm (GUIMARÃES et al., 2019). As leituras foram feitas em espectrofotômetro da marca HACH modelo DR 2800. A curva foi elaborada operando o fotobiorreator coluna de bolhas em batelada com meio Bold basal modificado (BBM) (Tabela 3). Quando a fase estacionária de crescimento foi alcançada uma alíquota concentrada (solução estoque) do reator foi coletada e diluída em 10 concentrações diferentes, sendo quantificada a absorbância de cada um dos pontos da curva. Por fim, com o volume remanescente no fotobiorreator, foi feita a colheita para determinar a concentração de biomassa da solução estoque, relacionando-a com as absorbâncias obtidas nas leituras de cada diluição, e plotando a curva de calibração através do software *Excel 2016* (Anexo).

3.5 Adaptação do inóculo à água residuária

Antes do ensaio cinético e da operação dos fotobiorreatores (PBRs), foi feita a etapa de adaptação do inóculo à água residuária. O processo de adaptação foi feito por bateladas sequenciais em um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas com volume útil de 1,0 L. O PBR

utilizado foi alimentado com concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal ($C_1=7,05\text{mg.L}^{-1}$, $C_2=14,09\text{mg.L}^{-1}$, $C_3=28,19\text{ mg.L}^{-1}$, $C_4 =56,38\text{ mg.L}^{-1}$) e mantido em operação até que a fase exponencial de crescimento e a concentração aproximada de biomassa de $1,2\text{ g.L}^{-1}$ em cada condição fosse alcançada. Em seguida, as bateladas foram interrompidas, sendo removidos 70 % do volume útil do fotobiorreator e preenchidos novamente com 700 mL de água residuária diluída e suplementada com meio basal. Alcançada a concentração de substrato máxima tolerada pelas microalgas, ou seja, concentração de substrato onde não ocorreu inibição e morte celular, o inóculo foi coletado e encaminhado para as próximas etapas do projeto.

3.6 Ensaio cinético de crescimento microbiano

O objetivo desse ensaio foi avaliar o crescimento das microalgas, por meio do monitoramento da produção acumulativa de biomassa (X), e determinar a concentração de substrato ótima (S_{opt}) de operação dos fotobiorreatores (PBRs).

O inóculo utilizado nessa etapa foi proveniente de um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas (PBR) operado em bateladas sequenciais com efluente agroindustrial em concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal, conforme descrito no item 3.5. A concentração de microalgas (X) no inóculo adaptado foi de aproximadamente $1,2\text{ g.L}^{-1}$.

Para o ensaio cinético, foram estudadas 6 diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal: $C_1=7,05\text{mg.L}^{-1}$, $C_2=14,09\text{mg.L}^{-1}$, $C_3=28,19\text{ mg.L}^{-1}$, $C_4 =56,38\text{ mg.L}^{-1}$, $C_5=112,76\text{ mg.L}^{-1}$, $C_6=169,14\text{ mg.L}^{-1}$. Solução de nutrientes (meio basal) foram adicionadas aos frascos de reação para otimizar a atividade dos microrganismos. O meio basal (Bold Basal) foi preparado conforme descrito na Tabela 3 do item 3.2. O pH dos reatores foi monitorado e controlado em 7,5, através da adição de ácido sulfúrico diluído (0,05M), para evitar a formação de sulfetos e a volatilização do nitrogênio amoniacal devido a conversão do íon amônio (N-NH_4^+) a amônia livre (N-NH_3). Por fim, foram preparados 3 frascos de controle negativo, com inóculo em meio basal sem água residuária.

Como reatores foram utilizados frascos *Schott Duran* de 500 mL. O volume útil dos frascos foi de 150 mL, sendo que um terço do volume útil foi preenchido com inóculo (33% v/v). Os ensaios foram feitos em triplicata adicionando-se ao inóculo 100 mL de água residuária diluída (7,05; 14,09; 28,19; 56,38; 112,76; 169,14 $\text{mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$) e suplementada com meio basal.

Posteriormente, os frascos foram incubados em batelada, a uma temperatura de 26°C, sob agitação de 200 rpm, em uma incubadora *shaker*. Este equipamento foi mantido em sala climatizada, isolada da luz solar. A luz utilizada como fonte de energia pelas microalgas foi fornecida exclusivamente por lâmpadas de LED de 6W ligadas 24 horas, resultando em iluminância estimada em 4,6 klux (ELERBROCK ZORN et al., 2018).

As microalgas foram cultivadas sem aeradores, ou seja, não foi feita a alimentação de CO₂ (cilindros de gás carbônico) e a agitação pneumática, portanto, as fontes de carbono dos microrganismos foram apenas o carbono orgânico contido na água residuária, o bicarbonato de sódio do meio basal e o CO₂ presente na atmosfera, introduzido pelo *headspace*, por conta da agitação constante dos frascos (mistura completa). A incubação durou 7 dias até que a produção de biomassa cessasse.

A produção de biomassa dos cultivos foi quantificada pelo método espectrofotométrico, monitorando o crescimento celular nos frascos, a cada 24 horas, a partir da quantidade de luz absorvida pelo analito. As leituras foram feitas em cubeta de quartzo. O espectrofotômetro utilizado foi um espectrofotômetro da marca HACH modelo DR 2800. O comprimento de onda selecionado foi de 680 nm (GUIMARÃES et al., 2019). Os resultados de absorbância obtidos no monitoramento foram posteriormente convertidos em gramas de biomassa por litro (X) através da curva de calibração da biomassa elaborada no item 3.4.

3.6.1 Modelos cinéticos ajustados aos ensaios de crescimento microbiano

Os perfis de produção de biomassa de cada condição foram ajustados ao modelo cinético de Gompertz-modificado (Equação 1) descrito por Mansouri (2017) através do software *Origin 8.0*

$$Y = C \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{m\acute{a}x} * \exp(1)}{C} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Nessa expressão, Y é a concentração de biomassa no tempo t; C é a assíntota de ln(X/X₀) no tempo t; $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica de crescimento máxima (d⁻¹); λ é o tempo de duração da fase lag (d) e t é o tempo (d).

Determinadas as velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$), foi construído o gráfico que relaciona as concentrações iniciais de substrato (S) com as velocidades específicas

de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) de cada condição, e testados os ajustes aos modelos cinéticos conhecidos, para obtenção dos parâmetros cinéticos e da concentração de substrato ótima de operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas (S_{opt}). Como foi observada inibição por substrato, o modelo cinético ajustado foi o modelo de Andrews (Equação 2), e o S_{opt} calculado pela Equação 3. O ajuste ao modelo de Andrews foi feito no software *Origin 8.0*.

$$\mu_X = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2)$$

$$S_{opt} = \sqrt{K_S * K_i} \quad (3)$$

Nessas expressões, μ_X é a velocidade específica de crescimento (d^{-1}); K_S é a constante de saturação definida pela equação de Monod ($mg.L^{-1}$); K_i é a constante de inibição pelo substrato ($mg.L^{-1}$) e S_{opt} é a concentração de substrato ótima de operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas ($mgN-NH_4^+.L^{-1}$).

3.7 Fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs)

As microalgas foram cultivadas em um sistema composto por três fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas em batelada, de volume total de 1,2 L cada, dotados de iluminação externa e agitação pneumática. Cada fotobiorreator foi composto por coluna de vidro de 5 mm de espessura de parede, diâmetro interno de 65 mm, altura de 450 mm e volume útil de 1,0 L. O sistema de aeração constituiu de um difusor (do tipo pedra porosa, com 3 cm de diâmetro), localizado na base de cada uma das colunas, conectado por mangueira de silicone a um compressor de ar diafragmático com vazão de 4 $L.min^{-1}$ para a dispersão de microbolhas de ar no sistema.

As microalgas foram cultivadas nos fotobiorreatores (PBRs) sem a alimentação de CO_2 (cilindros de gás carbônico), apenas bolhas de ar foram injetadas no sistema pelos difusores, portanto, as fontes de carbono dos microrganismos foram o carbono orgânico contido na água residuária, o bicarbonato de sódio do meio basal e o CO_2 presente nas bolhas de ar do sistema de agitação pneumática.

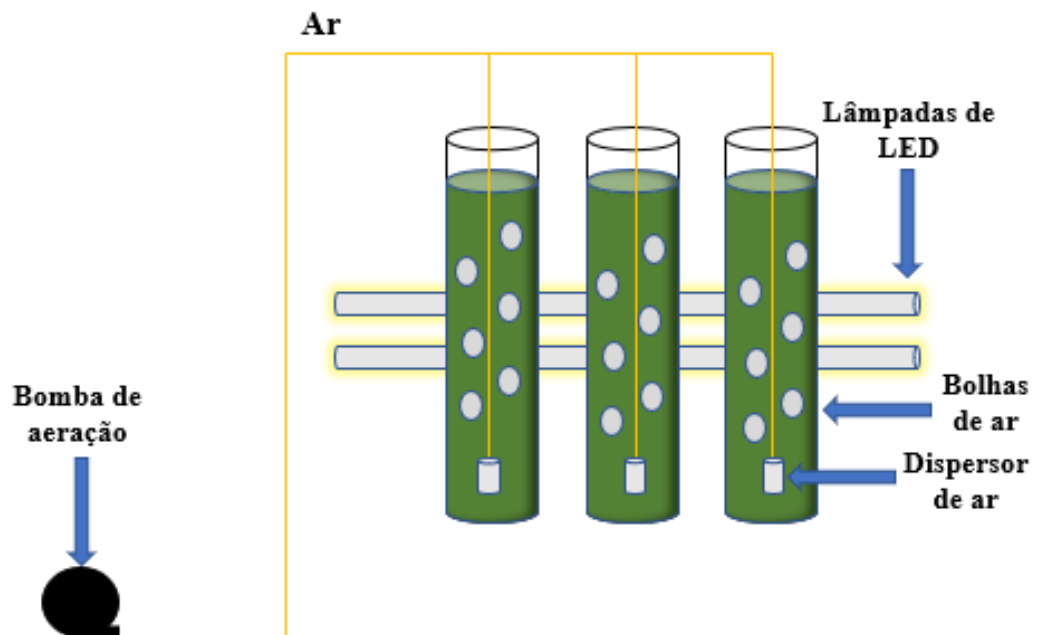
A agitação pneumática foi fornecida por um compressor de ar BOYU (modelo S-510). Os fotobiorreatores (PBRs) foram mantidos em sala climatizada ($26^\circ C$), isolada da luz solar. A

iluminância (estimada em 4,6 klux), foi fornecida exclusivamente por lâmpadas tubulares de LED de 9W ligadas 24 horas (ELERBROCK ZORN et al., 2018).

O inóculo utilizado na operação dos fotobiorreatores foi proveniente de um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas (PBR) operado em bateladas sequenciais com efluente agroindustrial em concentrações crescentes de nitrogênio amoniacal, conforme descrito no item 3.5. O volume de inóculo foi de 33% (v/v) e a concentração celular do inóculo adaptado (X) foi de aproximadamente $1,2 \text{ g.L}^{-1}$.

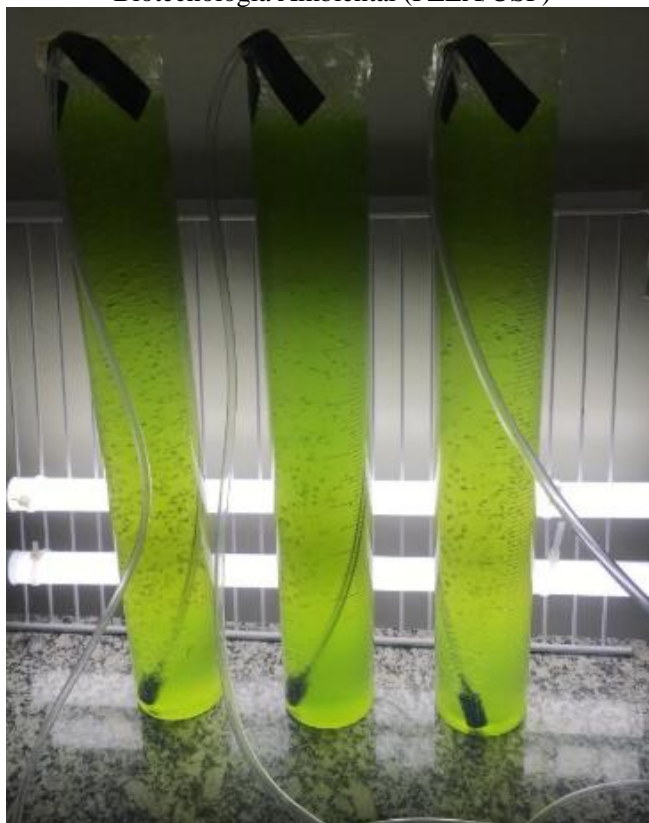
Como substrato foi utilizada a mesma água residuária do ensaio cinético de crescimento, coletada no reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) da GELITA Brasil Ltda. Antes da partida dos fotobiorreatores (PBRs) a água residuária foi diluída para a concentração de substrato indicada pelo cinético (S_{opt}) e suplementada com meio basal. Após a operação dos fotobiorreatores na concentração de substrato ótima (S_{opt}), foram feitos também cultivos em triplicata nos mesmos fotobiorreatores (PBRs) apenas com meio basal (controle negativo), sendo utilizado como referência para a comparação dos processos. As figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, o desenho esquemático e a foto dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) utilizados.

Figura 8: Esquema dos fotobiorreatores (PBRs) utilizados para cultivo



Fonte: Próprio autor.

Figura 9: Fotobiorreatores coluna de bolhas utilizados no cultivo, operando no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (FZEA/USP)



Fonte: Próprio autor.

3.7.1 Monitoramento dos cultivos

O crescimento das microalgas durante os cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) foi acompanhado por análise de absorvância em espectrofotômetro da marca HACH modelo DR 2800, selecionando o comprimento de onda de 680 nm para a realização das leituras de absorvância a cada 24 horas. Utilizando pipetador automático, cerca de 5,0 mL do meio de cultivo foram coletados pela parte superior dos fotobiorreatores. O meio de cultivo contendo biomassa foi transferido para uma cubeta de quartzo e em seguida efetuou-se a leitura da absorvância.

Após a leitura da absorvância a amostra foi diluída e filtrada em sistema de filtração composto por bomba a vácuo, funil de buncher, kitassato e papel filtro 0,45 μm , removendo a fase sólida presente na amostra, para eliminar possíveis interferências na caracterização físico-química da água residuária. As amostras filtradas e diluídas foram caracterizadas físico-quimicamente em relação à concentração de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) e nitrato (N- NO_3^-) segundo a metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

O pH dos PBRs foi monitorado por pHmetro digital da marca Tecnal modelo TEC-03MP e controlado em 7,5 através da adição de ácido sulfúrico diluído (0,05M) para evitar a formação de sulfetos e a volatilização do nitrogênio amoniacal. As concentrações de oxigênio dissolvido (OD) foram acompanhadas utilizando sonda da marca SOP modelo YSI 55.

3.7.2 Modelos cinéticos de crescimento e consumo de substrato

Os perfis de produção de biomassa nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) foram ajustados ao modelo cinético de Gompertz-modificado (Equação 1), conforme descrito anteriormente no item 3.6.1, enquanto os consumos de nitrogênio amoniacal e nitrato foram ajustados ao modelo cinético de decaimento de primeira ordem, apresentado na Equação 4. Ambos os ajustes foram feitos através do software *Origin 8.0*.

$$S = S_0 + A e^{-\frac{k}{t}} \quad (4)$$

Nessa expressão, S é a concentração de substrato (mg.L^{-1}); S_0 é a concentração inicial de substrato (mg.L^{-1}); t é o tempo (d) e k é a constante de velocidade de primeira ordem (d^{-1}). A partir dos resultados de k obtidos na modelagem cinética foram calculadas as velocidades instantâneas de consumo de substrato (r_s) através da Equação 5.

$$r_s = -k.S_0 \quad (5)$$

3.7.3 Eficiência de remoção de nitrogênio

A água residuária foi caracterizada físico-quimicamente na entrada (S_0) e na saída (S_F) dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Os parâmetros avaliados foram nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) e nitrato (N-NO_3^-) (APHA, 2005). A partir dos resultados obtidos, foram calculadas as eficiências de remoção de nitrogênio (ER) através da Equação 6 (DANESHVAR et al., 2018).

$$\text{ER}(\%) = \frac{S_0 - S_F}{S_0} * 100 \quad (6)$$

Nessa expressão, ER é a eficiência de remoção de nitrogênio (%); S_F é a concentração final de substrato (mg.L^{-1}) e S_0 é a concentração inicial de substrato (mg.L^{-1}).

3.7.4 Colheita da biomassa

A colheita da biomassa foi feita por floculação, utilizando proveta de 2,0 L. A floculação foi realizada com a água residuária na saída dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs), adicionando 2 mL.L^{-1} da solução floculante de sulfato de alumínio ($1,0 \text{ eq.L}^{-1}$) para decantação da biomassa. Após cerca de 30 minutos em repouso, ocorreu a separação das fases com a concomitante decantação da biomassa na fase inferior da proveta, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Meio de cultivo antes (à esquerda) e após a adição da solução floculante de sulfato de alumínio (à direita)



Fonte: Próprio autor.

3.7.4.1 Filtração da biomassa

Após a separação das fases procedeu-se a retirada do excesso de água da superfície e em seguida, a biomassa decantada foi filtrada utilizando um sistema de filtração composto por kitassato e funil de porcelana de Buchner com papel de filtro. A Figura 11 mostra o sistema de filtração e a biomassa úmida obtida após a filtração

Figura 11: Sistema de filtração (à esquerda) e biomassa úmida (à direita)



Fonte: Próprio autor.

3.7.4.2 Pré tratamento da biomassa (secagem e trituração)

A biomassa úmida foi uniformemente distribuída sobre um vidro de relógio e levada para secar em estufa à temperatura de 55 – 60 °C por um período de 24 horas sendo posteriormente colocada em dessecadores buscando a estabilização da massa à temperatura ambiente. Após atingir massa constante (variação de massa desprezível) a biomassa foi triturada utilizando gral de porcelana e pistilo até atingir a consistência de um pó fino e homogêneo, isento de grumos ou pedaços, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12: Biomassa seca e moída



Fonte: Próprio autor.

3.7.5 Método de extração de lipídios

A extração dos lipídios via solventes orgânicos foi feito seguindo a metodologia descrita por Bligh e Dyer, (1959) e modificada por Elerbrock Zorn et al. (2018).

3.7.5.1 Hidratação da biomassa e quebra da parede celular

A biomassa seca, homogenizada e triturada, obtida conforme descrito anteriormente na etapa de pré-tratamento (item 3.7.4.2), foi encaminhada para balança de umidade sendo quantificado o teor de água presente na fase sólida. Em seguida, 1,0 g de biomassa foi pesada em erlenmeyer de 125 mL, e com pipetador automático adicionou-se o volume de água necessário para atingir a umidade de 64% recomendada por Elerbrock Zorn et al. (2018). A água foi uniformemente distribuída sobre a biomassa. Por fim, o erlenmeyer foi manualmente homogeneizado por 1 minuto e colocado por 30 minutos em banho de ultrassom para promover

a completa hidratação e rompimento da parede celular. A Figura 13 ilustra o sistema de hidratação.

Figura 13: Sistema de hidratação da biomassa (banho de ultrassom)



Fonte: Próprio autor.

3.7.5.2 Extração dos lipídios

Com a biomassa hidratada, foi seguida a seguinte sequência analítica para todas as extrações:

Etapa 1: Adicionou-se 9,4 mL de clorofórmio e 10,2 mL de metanol, cuidadosamente com pipeta graduada, ao erlenmeyer contendo a biomassa hidratada. Em seguida, foi feita agitação manual por 2,0 minutos e agitação por banho de ultrassom por 35 minutos.

Etapa 2: Após os 35 minutos no ultrassom, o erlenmeyer foi retirado, sendo adicionado mais 9,4 mL clorofórmio, e encaminhando-o ao banho de ultrassom novamente por mais 35 minutos.

Etapa 3: Por fim, adicionou-se 3,4 mL de água destilada ao erlenmeyer promovendo a separação das fases (Fase 1: metanol e água; Fase 2: clorofórmio e lipídios).

Após a separação das fases, foi feita a filtração da solução em papel filtro de 12,5 cm de diâmetro, filtragem média. A biomassa ficou retida no filtro e o filtrado foi coletado em um funil de separação de vidro de 250 mL. O filtrado foi mantido em repouso por 24 horas até que a total separação das fases fosse estabelecida. A figura 14 ilustra o sistema de separação de fases utilizado.

Figura 14: Sistema de separação de fases



Fonte: Próprio autor.

A fase 2 composta por clorofórmio e lipídios foi cuidadosamente coletada em frascos de vidros previamente pesados. Os frascos foram então encaminhados para a estufa a 60°C para evaporação do solvente por um período de 24 horas. Finalizada a etapa de evaporação, os frascos foram retirados da estufa e colocados em dessecador por 15 minutos, para resfriamento a temperatura ambiente. Os frascos foram novamente pesados e sua massa final registrada. O percentual de lipídios extraídos da biomassa foi determinado conforme a Equação 7.

$$\% \text{ lipídios} = \frac{\text{Massa final de lipídios (g)}}{\text{Massa inicial de biomassa (g)}} * 100 \quad (7)$$

3.7.6 Produtividade de biomassa e lipídios

Quantificada a concentração de biomassa por espectrofotometria, e o teor de lipídios pela extração com solventes orgânicos, foi calculada a produtividade de biomassa (P_B), através da Equação 8, e a produtividade de lipídios (P_L), através da Equação 9. O cálculo da produtividade de lipídios foi feito multiplicando a produtividade de biomassa (P_B) pela fração mássica de lipídios (F_M) (GRIFFITHS; HARRISON, 2009):

$$P_B = \frac{(X_F - X_O)}{(t_F - t_O)} \quad (8)$$

$$P_L = P_B * F_M \quad (9)$$

Nessas expressões, P_B é a produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); P_L é a produtividade de lipídios ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$); X_F é a concentração final de biomassa (g.L^{-1}); X_O é a concentração inicial de biomassa (g.L^{-1}); F_M é a fração mássica de lipídios presente na biomassa e t é o tempo (d).

3.7.7 Análise estatística

Para confirmar estatisticamente quais condições exerceram maior influência no processo de produção de biomassa (variável resposta), ou seja, para ter significância estatisticamente comprovada entre as médias, utilizou-se a ANOVA (Análise de Variância). Os dados de produtividade de biomassa (P_B), utilizados na análise estatística, foram calculados (Equação 8) a partir dos resultados de concentração de biomassa obtidos por espectrofotometria durante o monitoramento dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs).

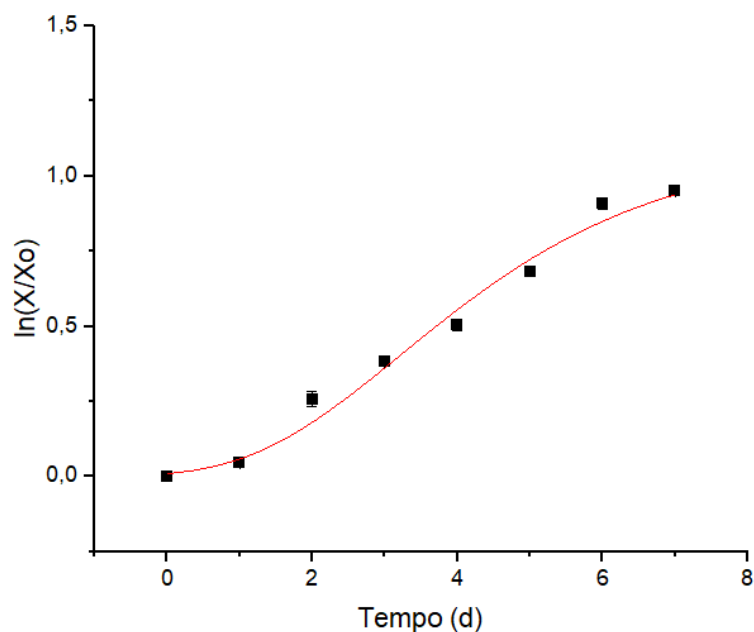
Primeiramente, antes da análise de variância foi verificada a normalidade e a igualdade de variância dos dados amostrais de cada grupo através do software *Minitab* versão 17. Em seguida, utilizando a ANOVA foram determinados os valores de *p-value* que indicaram se houve diferença significativa entre as médias das condições de cultivo estudadas. Aceitou-se a hipótese nula, de que as médias são iguais, nos casos onde os valores de *p-value* indicado pelo ANOVA foram superiores aos valores de *p-value* definido pelo intervalo de confiança. Nesse projeto foi utilizado intervalo de confiança de 95%, $p\text{-value}=0,05$. Entretanto nos casos onde $p\text{-value}<0,05$ aceitou-se a hipótese alternativa de que as médias dos grupos são diferentes. Quanto menores os valores de *p-value*, maior o grau de confiança da análise. A análise de variância (ANOVA) também foi feita no software *Minitab* versão 17.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

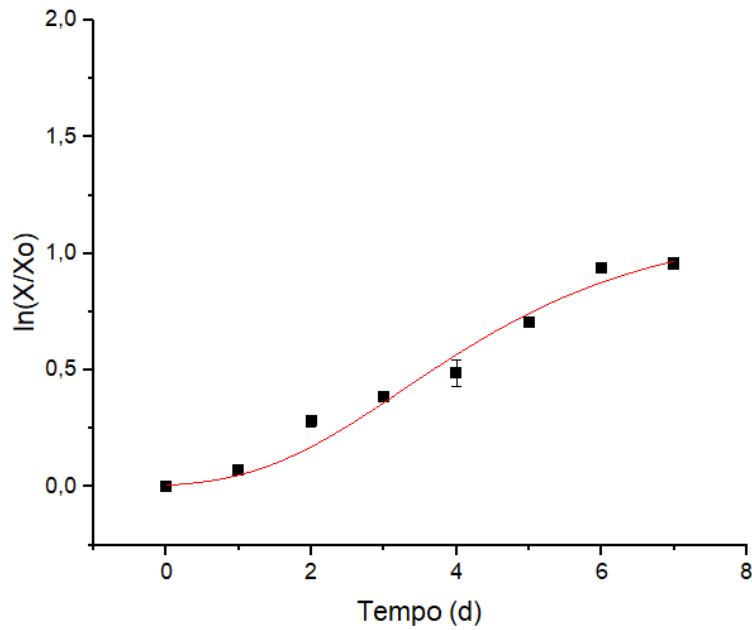
4.1 Parâmetros cinéticos de crescimento microbiano

Os resultados de produção de biomassa obtidos em cada condição do ensaio cinético foram ajustados ao modelo de Gompertz-modificado para obtenção das velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$). Como na condição C₆ ocorreu morte celular, não foi feito ajuste. Os ajustes não lineares feitos para cada condição do ensaio cinético estão apresentados nas Figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20.

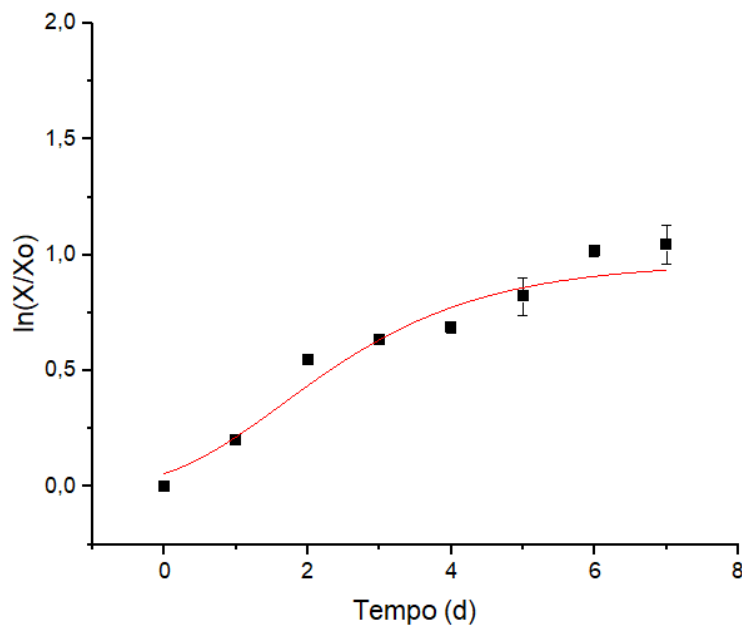
Figura 15: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo no controle negativo (BBM).



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

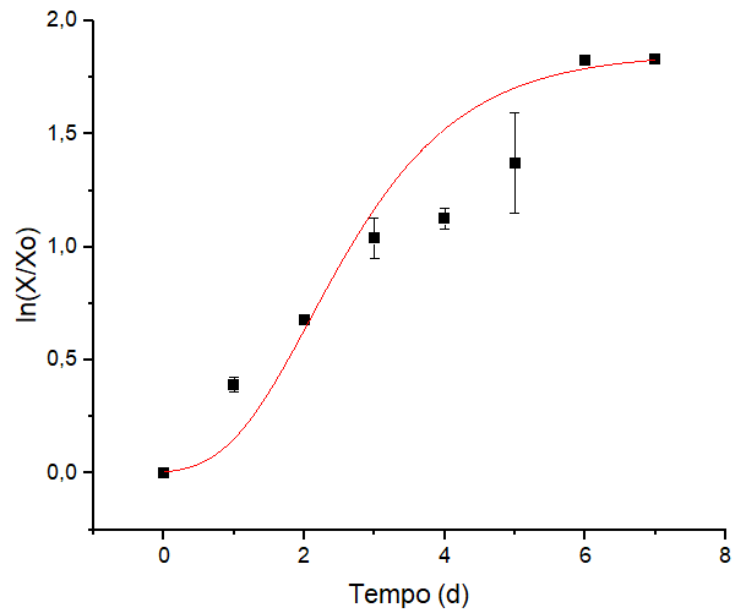
Figura 16: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo na condição C₁

Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

Figura 17: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo na condição C₂

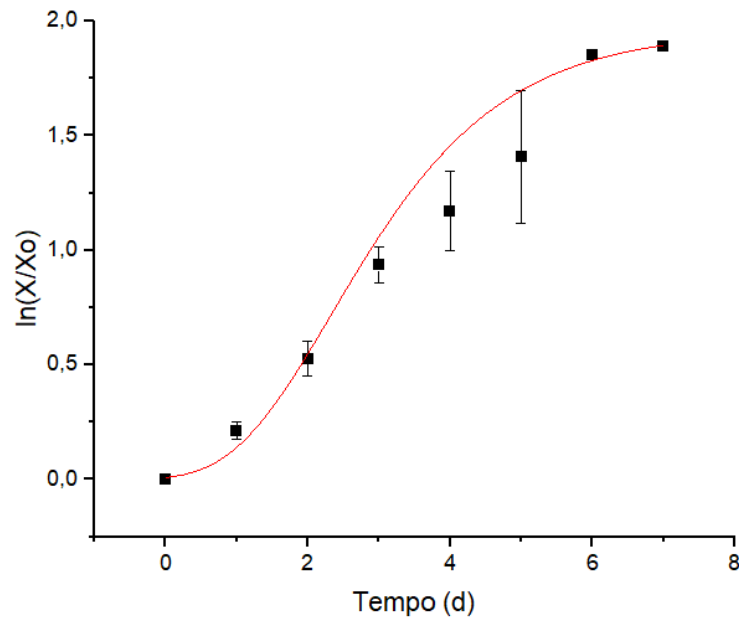
Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

Figura 18: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo na condição C₃

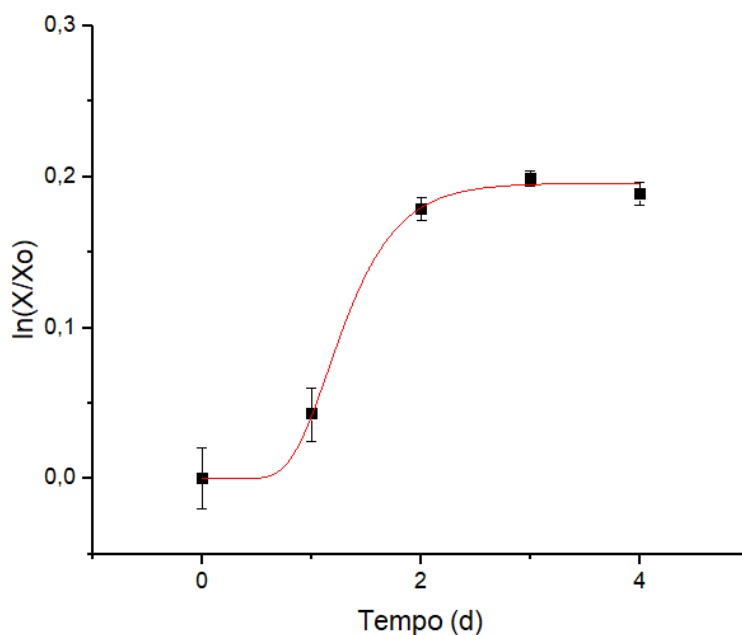


Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo de cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

Figura 19: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo na condição C₄



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

Figura 20: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo na condição C₅

Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado.
Fonte: Próprio autor.

Em seguida, com os resultados das velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e do tempo de duração da fase lag (λ), obtidos a partir da Equação 1, apresentada no item 3.6.1, foi criada a Tabela 5 para melhor visualização dos resultados.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos através dos ajustes não lineares (modelo cinético de Gompertz-modificado).

Condição	Nitrogênio Amoniacal (mgN-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	λ (d)	R ²
Controle	0,0	0,179 ± 0,026	0,97 ± 0,27	0,9879
C ₁	7,05	0,177 ± 0,018	0,89 ± 0,31	0,9832
C ₂	14,09	0,240 ± 0,055	0,10 ± 0,43	0,9716
C ₃	28,19	0,316 ± 0,047	0,03 ± 0,42	0,9733
C ₄	56,38	0,363 ± 0,035	0,63 ± 0,24	0,9904
C ₅	112,76	0,211 ± 0,029	0,80 ± 0,04	0,9986
C ₆	169,14	0,0	0,0	0,0

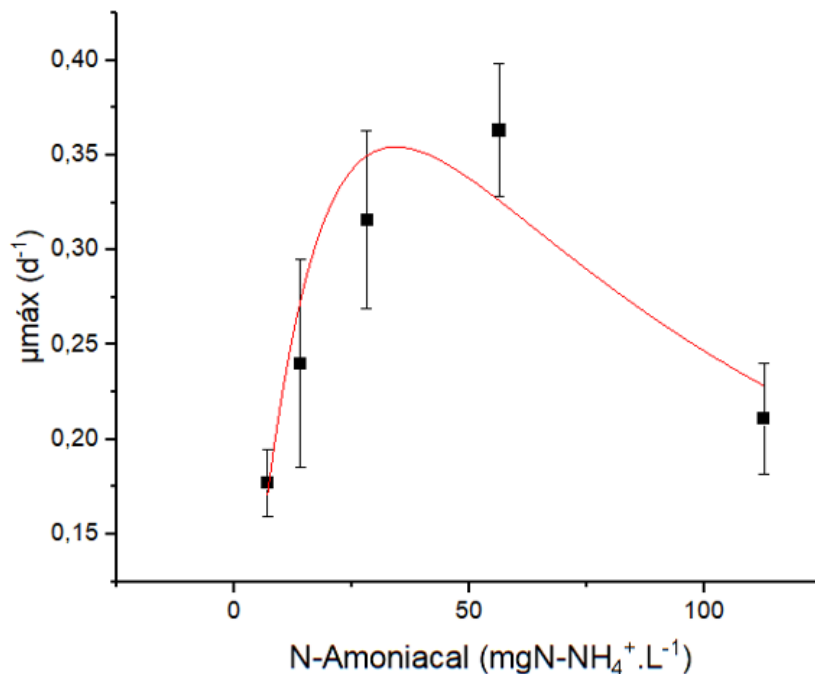
Fonte: Próprio autor.

Interpretando os dados, é possível observar que o aumento da concentração de substrato (N-Amoniacal) no meio de cultura proporcionou aumento nas velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$). Entretanto, nas condições em que as concentrações de nitrogênio amoniacal eram superiores a 56,8 mgN-NH₄⁺.L⁻¹ houve decréscimo na velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), indicando inibição por conta do excesso de substrato.

Analisando os resultados do tempo de duração da fase lag (λ), observa-se que o tempo foi relativamente baixo em todas as condições comprovando que o processo de adaptação do inóculo à água residuária foi eficiente. Nota-se que o controle apresentou a maior fase lag entre as condições testadas e que conforme a disponibilidade de nitrogênio amoniacal no meio aumentou, a fase lag (λ) foi reduzindo, isso se deve ao fato de que as microalgas possuem maior afinidade ao nitrogênio amoniacal, em comparação aos compostos nitrogenados oxidados, que exigem um maior consumo energético no processo de assimilação. Porém, na condição C4 e C5, onde as concentrações de nitrogênio amoniacal eram consideravelmente maiores, houve um aumento gradativo da fase de latência.

Sendo assim, após avaliar o comportamento das velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e dos tempos de duração da fase lag (λ), o modelo de Andrews (Equação 2) foi proposto, e ajustado para descrever o comportamento dos microrganismos. A partir do modelo foram obtidos os parâmetros cinéticos $\mu_{m\acute{a}x}$, K_s e K_i , sendo de $1,27\text{ d}^{-1}$, $50,25\text{ mg.L}^{-1}$ e $28,12\text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente. O ajuste ao modelo de Andrews é ilustrado na Figura 21.

Figura 21: Velocidade específica de crescimento máxima em função da concentração de substrato inibitório (Modelo cinético de Andrews).



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Andrews.
Fonte:Próprio autor.

Visto que o modelo cinético de Andrews ajustou-se de forma satisfatória ao crescimento microbiano ($R^2=0,872$), e que houve inibição por excesso de substrato, a concentração de substrato para operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas ($S_{opt}=37,59\text{mgN-NH}_4^+.\text{L}^{-1}$) foi determinada (Equação 3). Tam e Wong (1996) também fizeram experimentos para avaliar a influência da concentração de nitrogênio amoniacal no crescimento das microalgas da espécie *C.vulgaris*. Os ensaios foram feitos em meios de cultura sintéticos com diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal (fonte exclusiva de nitrogênio no meio). Nesse estudo, as microalgas foram cultivadas fotoautotroficamente em frascos reatores cônicos, com volume útil de 400 mL, operados em batelada sem alimentação de CO_2 e com agitação pneumática.

Comparando os resultados das concentrações de nitrogênio amoniacal ótimas (S_{opt}), é possível observar que a concentração obtida por Tam e Wong (1996), foi aproximadamente 6 vezes maior. Essa variação é previsível, pois no ensaio feito por Tam e Wong (1996) foram utilizados pH igual a 7,0 e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Portanto, devido ao deslocamento do equilíbrio químico da reação, todo o nitrogênio amoniacal esteve presente na forma iônica de amônio (N-NH_4^+), que é menos tóxico as microalgas. Enquanto isso, no ensaio cinético feito no presente projeto, o pH foi ajustado e monitorado em 7,5 e como fonte de nitrogênio foi utilizada água residuária industrial, conseqüentemente, uma parcela do nitrogênio amoniacal esteve presente na forma de amônia livre (N-NH_3), que é tóxica ao metabolismo dos microrganismos. Segundo Azov e Goldman (1982), se o pH da cultura estiver próximo ou acima de 8,0, a fotossíntese de algas é inibida por concentrações de amônia livre de 28mg.L^{-1} . Isso explica porque durante o ensaio de Tam e Wong (1996) a *Chlorella vulgaris* ainda mantinha certo crescimento em concentrações de nitrogênio amoniacal de 1000mg.L^{-1} e porque seu S_{opt} de operação foi 6 vezes maior.

O pH dos cultivos foi monitorado diariamente durante o ensaio cinético, sendo verificado aumento de 0,1 a 0,4 por dia. As variações foram corrigidas para o valor inicial de 7,5 adicionando alíquotas de ácido sulfúrico (0,05M). A constante variação do pH do meio de cultura, explica-se por conta da fixação fotossintética do CO_2 resultando no deslocamento do pH para a alcalinidade. Autores afirmam que, normalmente, em cultivos mixotróficos o pH final dos ensaios dependerá do metabolismo dominante, autotrófico ou heterotrófico, mantendo-se geralmente constante ao longo dos processos (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; KONG et al., 2011). Portanto, devido ao constante aumento do pH, pode-se afirmar que o metabolismo predominante durante o crescimento das microalgas no ensaio cinético foi o metabolismo autotrófico.

Em relação aos valores das velocidades específicas de crescimento máximas obtidos nas concentrações de substratos desse projeto ($0,363 \text{ d}^{-1}$) e do trabalho de Tam e Wong (1996) ($0,236 \text{ d}^{-1}$), a diferença significativa entre os resultados justifica-se pela diferença na composição dos meios de cultivos e pelo melhor comportamento hidrodinâmico dos frascos dentro do *shaker* (mistura completa) em comparação aos frascos cônicos com agitação pneumática, eliminando zonas mortas, e favorecendo a homogeneização do sistema e a transferência de massa entre o substrato e os microrganismos (WANG; LAN; HORSMAN, 2012).

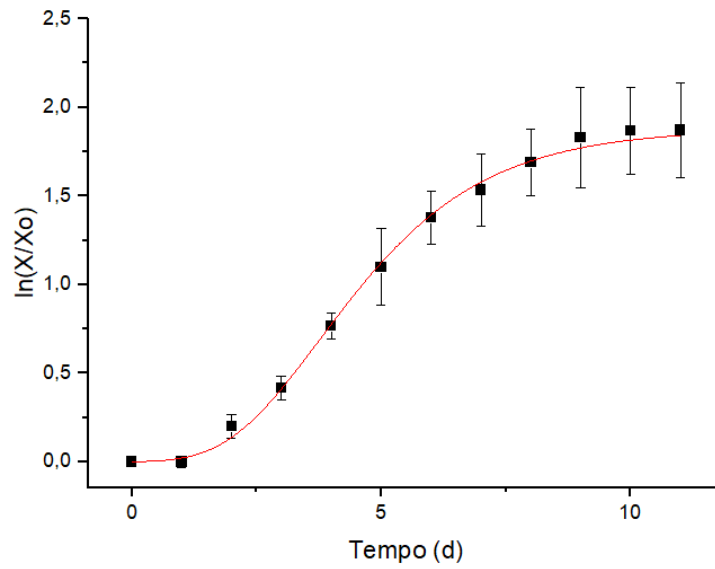
O oxigênio dissolvido (OD) dos frascos reatores também foi monitorado diariamente durante os cultivos feitos no ensaio cinético, não sendo verificadas alterações em relação a sua concentração inicial ($\text{OD} = 5,69 \text{ mg.L}^{-1}$), dessa forma, é possível afirmar que a estratégia de desgaseificação proposta (*headspace*) foi eficiente.

4.2 Fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs)

4.2.1 Modelagem cinética do crescimento microbiano

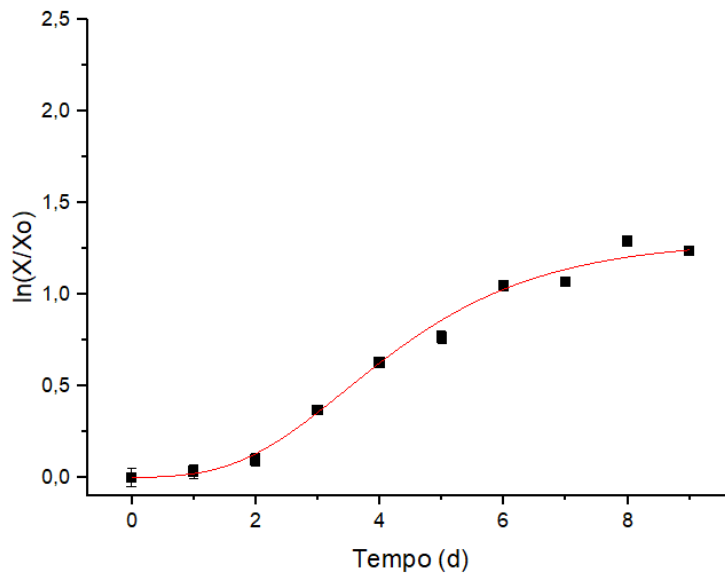
Obtidos os parâmetros cinéticos do crescimento microbiano (item 4.1), e determinada a concentração de substrato ótima de operação, foi dada partida nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) em batelada. As curvas de crescimento microbiano foram ajustadas ao modelo cinético de Gompertz-modificado pelo software *Origin 8.0*. Os ajustes aos crescimentos das microalgas nos fotobiorreatores (PBRs) com água residuária suplementada e com meio artificial (controle negativo) são ilustrados nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* em função do tempo nos fotobiorreatores coluna de bolhas com água residuária



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado. Fonte: Próprio autor.

Figura 23: Perfil de crescimento das microalgas *Chlorella vulgaris* nos fotobiorreatores coluna de bolhas com meio artificial Bold Basal modificado (Controle)



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Modelo cinético de Gompertz-modificado. Fonte: Próprio autor.

A partir dos ajustes não lineares dos modelos cinéticos, foram obtidas as velocidades específicas de crescimento máximas ($\mu_{m\acute{a}x}$) e o tempo de duração da fase lag (λ), utilizadas na elaboração da Tabela 6, para melhor visualização e interpretação dos resultados.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) obtidos através dos ajustes não lineares (Gompertz-modificado).

Condição	Nitrogênio Amoniacal (mgN-NH ₄ ⁺ .L ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	λ (d)	R ²
PBRs com BBM (Controle)	0,0	0,256 ± 0,02	1,68 ± 0,23	0,992
PBRs com água residuária suplementada	44,30	0,343 ± 0,01	1,77 ± 0,08	0,999

Fonte: Próprio autor.

Observa-se que a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) dos cultivos nos fotobiorreatores, operados nas condições ótimas determinadas pelo ensaio cinético de crescimento microbiano, alcançaram valores muito próximos (0,34 d⁻¹) aos obtidos na condição C₄ do ensaio cinético (0,36 d⁻¹), portanto, é possível afirmar que a modelagem matemática do processo (item 4.1) foi coerente e proporcionou uma operação otimizada dos PBRs.

Porém, não foi verificada a mesma coerência entre os dados do tempo de duração da fase lag (1,77 dias), que foram superiores aos valores definidos anteriormente na condição C₄ e no controle negativo do ensaio cinético. Esse aumento no tempo de duração da fase lag (λ), justifica-se pelo fato do sistema de agitação pneumática dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) não ter sido tão eficiente quanto o *shaker* no processo de homogeneização e transferência de massa, dessa forma, afirma-se que os fotobiorreatores do tipo coluna de bolhas não operaram como reatores batelada de mistura completa ideal, resultando em um maior período de adaptação dos microrganismos (WANG; LAN; HORSMAN, 2012).

Comparando os resultados de $\mu_{m\acute{a}x}$ e X_F obtidos, é possível verificar que nos cultivos de microalgas em fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs), a adição de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) proporcionou aumento da velocidade específica de crescimento máxima (0,34 d⁻¹) e da produção de biomassa (1,83 g.L⁻¹) em relação ao controle negativo. Isso se deve pela

maior afinidade dos microrganismos a assimilação do nitrogênio na forma reduzida (N-Amoniacal), que requer um menor consumo de energia em comparação aos compostos nitrogenados oxidados (N-NO₂⁻ e N-NO₃⁻). Portanto, embora seja necessário diluir o efluente, o aumento da velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) e da produção de biomassa (X_F) proporcionado demonstram o potencial da utilização de águas residuárias das indústrias de gelatina digeridas por via anaeróbia como meio de cultivo para o crescimento das microalgas *C.vulgaris*.

Mansouri (2017) modelou o crescimento de microalgas da espécie *C.vulgaris* cultivadas fotoautotróficamente, em fotobiorreatores do tipo *airlift* de 20 L, contendo meio de cultura artificial (BG-11), utilizando apenas nitrato (1,5 g.L⁻¹) como fonte de nitrogênio. Nesse trabalho, o modelo cinético que melhor se ajustou foi o modelo de Baranyi ($R^2=0,989$), entretanto, o modelo de Gompertz-modificado também apresentou um bom coeficiente de correlação ($R^2=0,954$). No ajuste ao modelo de Baranyi, Mansouri (2017) obteve velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) de 0,741 d⁻¹ e produção de biomassa (X_F) de 1,81 g.L⁻¹. O valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ encontrado por Mansouri (2017) foi superior ao obtido no presente estudo, enquanto a produção de biomassa (X_F) atingiu valores praticamente iguais. A diferença na velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) justifica-se por conta dos cultivos terem sido feitos em duas configurações de fotobiorreatores diferentes (coluna de bolhas e *airlift*) e pela concentração extremamente elevada de nitrato (1,5 g.L⁻¹) utilizada. Os fotobiorreatores *airlift*, proporcionam uma distribuição mais uniforme e eficiente das bolhas de ar no sistema por conta do tubo interno instalado nesse tipo de reator, que reduz o tamanho das bolhas e direciona o fluxo dos gases, conseqüentemente, favorecendo a transferência de massa entre microrganismo e substrato, e a assimilação do gás carbônico, resultando assim em maiores velocidades específicas de crescimento máximas (WANG; LAN; HORSMAN, 2012).

O pH dos cultivos nos fotobiorreatores (PBRs) foi monitorado diariamente sendo verificado aumentos similares aos do ensaio cinético (item 4.1), de 0,1 a 0,4 por dia. A frequente variação do pH do processo, justifica-se por conta da fixação fotossintética do CO₂ que desloca o pH para a alcalinidade. Autores argumentam que, normalmente, em cultivos mixotróficos, o pH final dos ensaios dependerá do metabolismo dominante, autotrófico ou heterotrófico, mantendo-se usualmente constante ao longo dos cultivos (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; KONG et al., 2011). Nesse sentido, por conta do constante aumento do pH observado, verifica-se que o metabolismo predominante durante o crescimento das microalgas nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) foi o metabolismo autotrófico.

O oxigênio dissolvido (OD) foi monitorado diariamente durante os cultivos, não sendo verificadas alterações em relação a sua concentração inicial ($OD = 5,42 \text{ mg.L}^{-1}$), portanto, afirma-se que a estratégia de degaseificação (*headspace*) e o modelo de fotobiorreator escolhido proporcionaram uma eficiente remoção do oxigênio dissolvido presente no meio de cultura.

4.2.2 Análise estatística da produtividade de biomassa

Com os resultados do crescimento celular, obtidos por espectrofotometria durante o monitoramento da operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs), foram calculadas as produtividades de biomassa dos processos pela Equação 8, sendo montada a Tabela 7.

Tabela 7: Produtividade de biomassa (P_B) dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs).

Condição	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
PBRs com água residuária suplementada	$0,141 \pm 0,021$
PBRs com BBM (Controle)	$0,081 \pm 0,005$

Fonte:Próprio autor.

A partir dos resultados de produtividade de biomassa (P_B) calculados, foram feitos os testes de normalidade e de igualdade de variância dos grupos, considerando intervalo de confiança igual a 0,05, para verificar se os dados das populações seguem uma distribuição normal e possuem variâncias estatisticamente iguais, validando a possibilidade de utilização da análise de variância (ANOVA) como método estatístico de avaliação. Os testes de normalidade e igualdade de variância feitos no *Minitab 17* são apresentados no Anexo.

Interpretando e analisando os testes de normalidade, é possível observar que ambas as populações apresentaram uma distribuição normal dos dados e igualdade de variância, pois os valores de *p-value* são superiores aos valores do intervalo de confiança ($p\text{-value} = 0,05$), portanto a hipótese nula (H_0) é verdadeira e a análise de variância (ANOVA) é aplicável a esses conjuntos de dados. Verificada a normalidade e a igualdade de variância dos grupos, a análise de variância (ANOVA), ilustrada na Tabela 8, foi feita pelo software *Minitab 17*, considerando um intervalo de confiança de 0,05.

Tabela 8: Análise de variância da produtividade de biomassa dos fotobiorreatores (PBRs)

FV	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	F	<i>p-value</i>
Fator	1	0,005516	0,005516	17,74	0,014
Erro	4	0,001244	0,000311		
Total	5	0,006760			

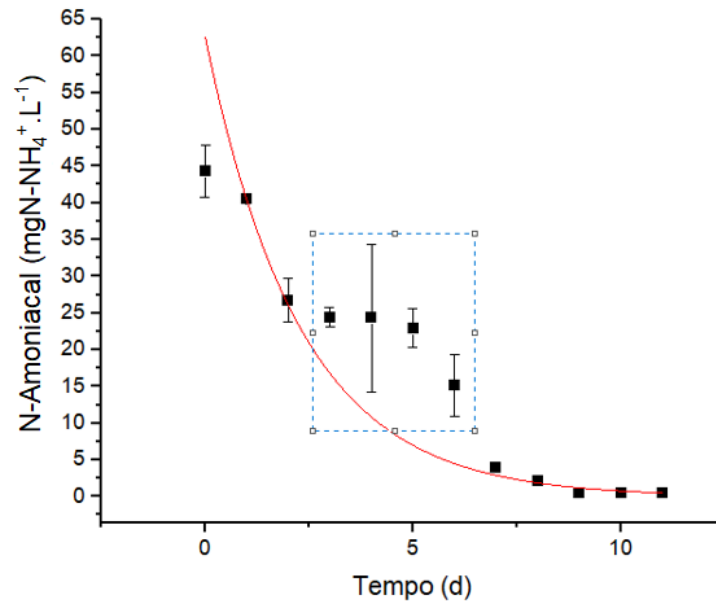
Fonte: Próprio autor.

Interpretando a tabela da ANOVA observa-se que o valor de *p-value* (0,014) foi inferior ao valor do intervalo de confiança (*p-value* =0,05), ou seja, houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de produtividade de biomassa dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs), confirmando a hipótese de que a adição de água residuária da indústria de alimentos digerida por via anaeróbia resulta em maiores produtividades de biomassa. O aumento na produtividade de biomassa utilizando água residuária foi de 57,45%.

4.2.3 Modelagem cinética do consumo de nitrogênio

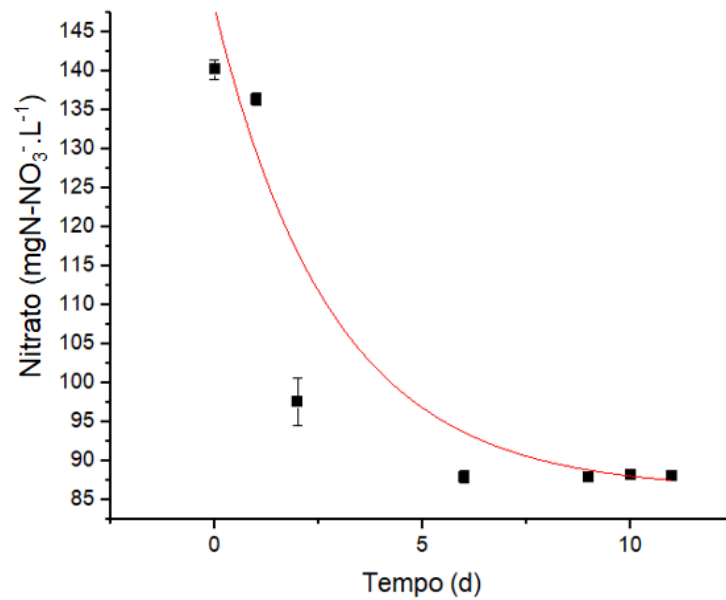
Foram quantificadas as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) e nitrato (N-NO₃⁻) durante a operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) com água residuária suplementada. Os resultados obtidos foram ajustados ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem (Equação 4) e ilustrados nas Figuras 24 e 25.

Figura 24: Ajuste do consumo de nitrogênio amoniacal nos fotobiorreatores ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem



Legenda 1: ■ Dados experimentais; Linha contínua: Modelo cinético de decaimento de 1º ordem.
Fonte: Próprio autor.

Figura 25: Ajuste do consumo de nitrato nos fotobiorreatores ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem



Legenda: ■ Dados experimentais; Linha contínua: Modelo cinético de decaimento de 1º ordem.
Fonte: Próprio autor.

A partir dos parâmetros cinéticos, obtidos através dos ajustes ao modelo de decaimento de 1º ordem, foi elaborada a Tabela 9, para melhor visualização dos resultados.

Tabela 9: Parâmetros cinéticos obtidos no ajuste ao modelo cinético de decaimento de 1º ordem no fotobiorreator (S_{opt})

Parâmetro	Nitrogênio Amoniacal	Nitrato
k (d^{-1})	0,082	0,485
r_s ($mg.L^{-1}.d^{-1}$)	3,63	67,99
R^2	0,9521	0,8988

Fonte: Próprio autor.

Os resultados de R^2 apresentados na Tabela 9, demonstram que o modelo cinético de decaimento de 1º ordem ajustou-se de forma satisfatória aos dados experimentais, enquanto os resultados de k e r_s indicam que as velocidades instantâneas de consumo de nitrato foram superiores às do nitrogênio amoniacal. Choi e Lee (2013) avaliaram as velocidades instantâneas de consumo de nitrogênio amoniacal (r_s) em cultivos de *C. vulgaris* feitos em frascos de 1,0 L contendo água residuária bruta coletada após o tratamento preliminar de uma estação de tratamento de esgoto. Nesse estudo, os fotobiorreatores foram operados em batelada com 10 diferentes concentrações de substrato (15,22 – 205,29 $mgN-NH_4^+.L^{-1}$) onde foram obtidas velocidades instantâneas de consumo de substrato de 0,92 a 5,37 $mgN-NH_4^+.L^{-1}.d^{-1}$. Quando a concentração de nitrogênio amoniacal no meio (45,20 $mgN-NH_4^+.L^{-1}$) foi similar à concentração utilizada na operação dos fotobiorreatores coluna de bolhas do presente projeto, a velocidade foi de 4,09 $mgN-NH_4^+.L^{-1}.d^{-1}$, 12,67 % superior à obtida no presente trabalho.

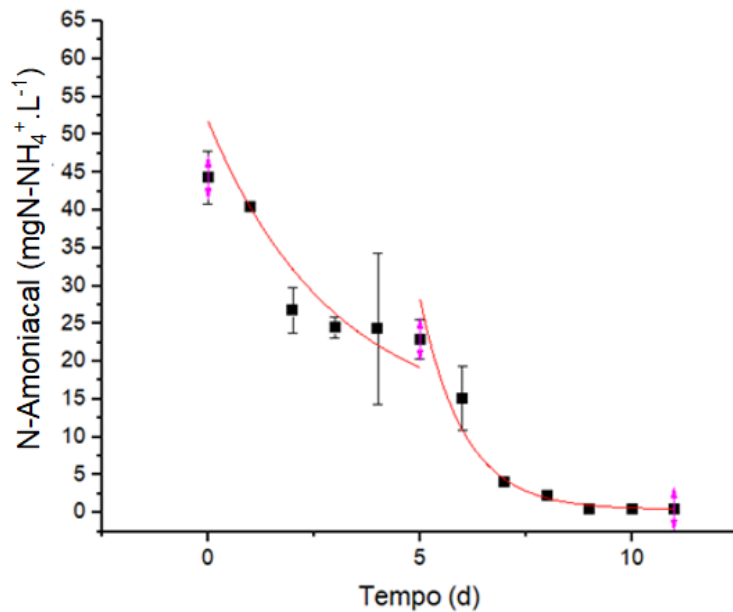
Interpretando o comportamento das curvas de crescimento e decaimento de substrato apresentadas nas Figuras 22, 24 e 25, é possível observar que durante a fase de latência (primeiros 3 dias) as microalgas consumiram tanto o nitrato quanto o nitrogênio amoniacal, sendo que, a partir do quinto dia o consumo de nitrato começou a demonstrar sinais de inibição, cessando completamente no sexto dia, enquanto o nitrogênio amoniacal foi assimilado constantemente até a fase estacionária de crescimento dos microrganismos. Esse comportamento confirma os resultados obtidos por Scherholz e Curtis (2013), que cultivaram culturas fotoautotróficas de *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii* em

fotobiorreatores de 1,5 L contendo concentrações de substrato de $0,0135 \text{ gN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$, com cloreto e nitrato como íons (NH_4Cl e NH_4NO_3^-). Nesse estudo, quando o nitrogênio amoniacal e o nitrato foram fornecidos simultaneamente, as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlamydomonas reinhardtii* deram preferência ao consumo de nitrogênio amoniacal inibindo o consumo de nitrato. Todavia, observa-se que o conceito de Li et al. (2019) de que as microalgas irão consumir primeiramente o nitrogênio amoniacal em seguida o nitrito e por fim o nitrato não foi verificado.

Florencio e Vega (1983) monitoraram as concentrações de nitrogênio amoniacal e nitrato durante o crescimento de microalgas, sendo visto que o nitrogênio amoniacal também inibiu a utilização do nitrato e do nitrito. Tischner e Lorenzen (1979) afirmam que, dependendo da quantidade de nitrogênio amoniacal adicionado ao meio, essa inibição pode durar um longo período até que a velocidade inicial de captação de nitrato seja atingida novamente. Esta série de resultados confirmam a suspeita sobre a ação do nitrogênio amoniacal na captação e redução do nitrato expresso por Pistorius, Funkhouser e Voss (1978).

Dessa forma, foram observadas duas fases de decaimento no consumo do nitrogênio amoniacal, a primeira fase de decaimento do dia 1 ao dia 5, onde as microalgas ainda assimilavam nitrato, e a segunda fase de decaimento do dia 5 ao 10, onde a assimilação do nitrato foi inibida e coincidentemente, verificou-se falta de ajuste do modelo no mesmo período (parte destacada na Figura 24). Constatado esse comportamento, foi proposto o ajuste de dois modelos de decaimento de primeira ordem em série para as fases do consumo de N-Amoniacal, denominadas como Fase 1 e Fase 2 (antes e depois do consumo de nitrato cessar), respectivamente. Os ajustes em série ao modelo cinético de decaimento de substrato são ilustrados na Figuras 26.

Figura 26: Ajustes em série ao modelo de decaimento de 1º ordem para as duas fases de consumo de nitrogênio amoniacal.



Legenda: ■ Dados experimentais; Linha contínua: Modelo cinético de decaimento de 1º ordem.
Fonte: Próprio autor.

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos ajustes não lineares ao modelo de decaimento de primeira ordem encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos de consumo de nitrogênio amoniacal das fases 1 e 2.

Fase	k (d ⁻¹)	r _s (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	R ²
Fase 1 (antes)	0,453	20,06	0,9182
Fase 2 (depois)	0,617	15,02	0,9686

Fonte: Próprio autor.

Analisando o índice de correlação (R²), é possível verificar que o modelo de decaimento de primeira ordem ajustou-se de forma satisfatória as duas fases do consumo de substrato nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs), portanto, apesar do ajuste apresentado na Figura 24 também ter alcançado um bom coeficiente de correlação (R²) a análise do consumo de substrato por partes mostrou-se mais adequada a esse conjunto de dados. Em relação as constantes de velocidades de decaimento de nitrogênio amoniacal (k), observou-se que a partir do quinto dia, quando o consumo de nitrato foi inibido, as microalgas canalizaram toda a sua energia na

assimilação do nitrogênio amoniacal, conseqüentemente verificando-se aumento da constante de velocidade de decaimento de 0,453 para 0,617 d⁻¹. Todavia, como na fase 2 a concentração inicial de substrato (C₀) era inferior, apesar dos valores de k terem aumentado, as velocidades instantâneas de consumo de substrato (r_S) diminuíram. É importante ressaltar, porém, que ambos os resultados de r_S foram consideravelmente superiores aos obtidos por Choi e Lee (2013) em seu estudo.

4.2.4 Eficiência de remoção de nitrogênio

Foram avaliadas as eficiências de remoção de nitrogênio (ER) de amônio (98,85%) e nitrato (35,48%) ao longo dos cultivos nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) alimentados com água residuária suplementada (S_{opt}). Para comparar a remoção de nutrientes e o crescimento de sete espécies de microalgas diferentes, Wang et al. (2013) realizaram uma série de testes em batelada com águas residuárias de suinocultura digeridas por via anaeróbia. Os cultivos foram feitos em frascos reatores de 2,0 L com agitação pneumática, volume útil de 1,0 L, iluminância de 3.500 Lux e fotoperíodo de 12 h claro: 12 h escuro. O efluente foi diluído (fator de diluição: 15) em água da torneira para obter concentrações iniciais de nutrientes de 59,4 mg. L⁻¹ de N-Amoniacal e 90,7 mg.L⁻¹ de N_T. A eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal para as espécies *Hydrodictyaceae reticulatum*, *Scenedesmus obliquus*, *Oedogonium sp*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria amoena* e *Spirulina platensis* foram de 86,7; 93,2; 92,9; 91,7; 64,1; 72,3 e 76,7% respectivamente. Portanto, considerando que os fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) do presente projeto, alimentados com água residuária da indústria de alimentos digeridos por via anaeróbia e meio basal, alcançaram eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal de 98,85%, é confirmado o potencial das microalgas *C.vulgaris* em remover e assimilar compostos nitrogenados. Resultados semelhantes foram relatados por Wang et al. (2012), que cultivaram *C.pyrenoidosa* em águas residuárias de suinoculturas diluídas 10, 15, 20 e 40 vezes, com concentrações iniciais de substrato no meio de cultura de 138,8 a 34,7 mgN-NH₃.L⁻¹. Nesse trabalho, foram verificadas eficiências de remoção de 91,2 a 95,1% para N-NH₃ e de 54,7 a 74,6% para N_T. Por outro lado, em outro estudo feito por Kumar, Miao e Wyatt (2010), foi relatado que a remoção máxima de N-NH₃ obtida pela *C. vulgaris* em efluentes digeridos por via anaeróbia diluídos 50 vezes para concentrações iniciais de N-NH₃ de 20 mg.L⁻¹ foi de 61,8%, valor inferior ao alcançado pelos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) no presente projeto.

Em relação ao nitrato, Taziki et al. (2015) cultivou microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* e *Botryococcus braunii* a 25 ° C em meio composto 100% por água residuária (efluente doméstico coletado no tratamento secundário aeróbio da SANEPAR) em erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 125 mL, alcançando uma eficiência de remoção de 73,77% de nitrato nos cultivos de *Chlorella vulgaris* e 79,63% nos cultivos de *Botryococcus braunii*. Dessa forma, conclui-se que, por conta da inibição da absorção do nitrato pelo nitrogênio amoniacal, a eficiência de remoção de nitrato de 35,48% alcançada nos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) foi relativamente baixa.

4.2.5 Teor de lipídios totais e produtividade lipídica

Após a colheita da biomassa foi determinado o teor de lipídios totais e feito o cálculo da produtividade lipídica dos fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs). O teor de lipídios totais foi 0,1245 gramas, representando uma fração mássica de 12,45%, enquanto a produtividade lipídica foi de 17,63 mg.L⁻¹.dia⁻¹. Comparando os resultados da fração mássica de lipídios acumulados, com os resultados apresentados por Safi et al. (2014) (Tabela 2), que consideram que microalgas da espécie *C.vulgaris* acumulam de 5 a 58% de lipídios, afirma-se que a fração mássica obtida (12,45%) foi relativamente baixa. Esse fato justifica-se por conta da teoria descrita por Tan e Lee (2016), a qual afirma que a concentração de lipídios acumulados é inversamente proporcional a disponibilidade de nitrogênio do meio de cultura, portanto, como a concentração de nitrogênio total presente no meio era extremamente elevada, e sabendo que, mesmo após a interrupção do crescimento ainda havia nitrogênio no meio, o teor de lipídios totais acumulado pelas microalgas foi baixo. Dessa forma, o conceito dos autores de que microalgas cultivadas em condições ideais produzem grandes quantidades de biomassa, mas baixo teor lipídico neutro, enquanto microalgas cultivadas com escassez de nutrientes, acumulam altos níveis de lipídios neutros, mas crescem lentamente, foi verificado.

Matos et al. (2015) cultivaram microalgas da espécie *Chlorella sp* em biorreatores cônicos invertidos de 4,0 L, operados em batelada, com aeração constante, a temperatura de 27°C. Os biorreatores foram alimentados com meio de cultura artificial (BBM) e concentrado de dessalinização. O meio basal apresentava concentração de 250 mg.L⁻¹ de nitrato enquanto o concentrado de dessalinização possuía 1,35 mg.L⁻¹ de amônio e 30 mg.L⁻¹ de nitrogênio total. Nesse estudo, foi alcançada uma porcentagem de lipídios totais máxima de 11,46 % e produtividade lipídica máxima de 19,6 mg.L⁻¹.dia⁻¹, valores muito semelhantes ao obtidos no presente projeto.

Guimarães et al. (2019) cultivaram microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* em fotobiorreatores coluna de bolhas de 5,0 L sob iluminação e aeração constante. Os fotobiorreatores (PBRs) foram alimentados com efluente doméstico coletado do reator biológico aeróbio da estação de tratamento de efluentes da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. A água residuária apresentava concentração de 10,88 mg de N-NO_3^- . Nesse estudo o teor de lipídios acumulados foi de 16,4% e a produtividade lipídica foi de $0,0126 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, ou seja, o conteúdo lipídico foi maior que o obtido no presente projeto devido à baixa disponibilidade de nitrogênio no efluente doméstico, entretanto, a produtividade lipídica foi inferior pois, apesar do teor de lipídios por grama de biomassa ter sido alto, a produtividade de biomassa foi baixa ($0,0552 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Esse fenômeno explica-se pelo fato de que a disponibilidade de substrato é uma etapa limitante no equilíbrio do crescimento e da produção de ácidos graxos, assim, as vias de síntese de biomassa e de ácidos graxos competem pelos mesmos substratos (TAN; LEE, 2016).

No estudo feito por Guimarães et al. (2019), quando a produção de biomassa cessou e a disponibilidade de nutrientes era reduzida, os fotobiorreatores foram mantidos em operação por mais alguns dias para promover o estresse dos microrganismos, diferentemente do presente projeto onde a batelada foi interrompida no exato momento em que os microrganismos alcançaram a fase estacionária de crescimento, e que mesmo após a estagnação da produção de biomassa, havia aproximadamente 80 mg.L^{-1} de nitrato, que fez com que os microrganismos não fossem expostos a condições críticas de baixa disponibilidade de substrato no meio de cultura.

5 CONCLUSÃO

O cultivo de microalgas da espécie *C.vulgaris* em fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) com água residuária suplementada mostrou-se como uma alternativa viável e eficiente para a produção de biomassa e a remoção de compostos nitrogenados da água, principalmente do nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal). Pode-se verificar que a utilização de águas residuárias digeridas anaerobiamente proporcionou maiores velocidades específicas de crescimento e maiores produtividades de biomassa. Destaca-se a importância do controle das concentrações e o potencial tóxico do nitrogênio amoniacal, bem como a adaptação do inóculo ao efluente.

Os resultados experimentais do ensaio cinético de crescimento microbiano demonstraram a capacidade de crescimento dos microrganismos na água residuária, sendo que na concentração aproximada de $37,59 \text{ mgN-NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1}$ foram constatadas as condições ótimas de operação. O modelo de Andrews ajustou-se de forma satisfatória apresentando alto coeficiente de correlação (R^2), descrevendo corretamente a cinética microbiana, e proporcionando a operação otimizada do processo.

O monitoramento das concentrações de substrato durante os cultivos nos PBRs permitiu a observação do efeito inibitório do nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) na assimilação do nitrato (N-NO_3^-) e a maior afinidade dos microrganismos ao nitrogênio na forma reduzida. Foram alcançadas no processo eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal de 98,85% e de nitrato de 35,48%. O modelo cinético de primeira ordem ajustou-se bem aos dados de decaimento de ambos os substratos. Todavia, para obter uma melhor compreensão dos resultados de decaimento do nitrogênio amoniacal, foi necessário realizar o ajuste em série do modelo para as duas fases de decaimento. O teor de lipídios totais acumulados foi relativamente baixo devido à alta concentração de nitrogênio disponível no meio de cultura, porém, apesar do teor de lipídios ter sido baixo, a produtividade lipídica foi razoável por conta da alta produtividade de biomassa alcançada, demonstrando o potencial das microalgas da espécie *C.vulgaris* em integrar o pós tratamento de águas residuárias com a produção de biocombustíveis.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros recomenda-se operar os fotobiorreatores coluna de bolhas (PBRs) em modo contínuo, sem a suplementação de nitrato (N-NO_3^-), mantendo como fonte de nitrogênio apenas o nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal) e prolongar a operação do sistema quando a fase estacionária de crescimento for alcançada, promovendo um maior acúmulo de lipídios.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, A.; LEITE, G.; HALLENBECK, P. Addressing the challenges for sustainable production of algal biofuels: I. Algal strains and nutrient supply. **Environmental technology**, v. 34, p. 1783–805, 8 Oct. 2013.
- ADENIYI, O. M.; AZIMOV, U.; BURLUKA, A. Algae biofuel: Current status and future applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 316–335, 1 July. 2018.
- ALISHAH ARATBONI, H. et al. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 178, 21 Oct. 2019.
- ANSARI, F. A. et al. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. **Algal Research**, v. 21, p. 169–177, 1 Jan. 2017.
- APHA, AWWA, WEF (2005) Standard methods for examination of water and wastewater. 21st. ed. Washington DC, APHA.
- AZOV, Y.; GOLDMAN, J. C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 735–739, Apr. 1982.
- BAICHA, Z. et al. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104–116, 2016.
- BANERJEE, C.; DUBEY, K. K.; SHUKLA, P. Metabolic engineering of microalgal based biofuel production: prospects and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 31 Mar. 2016.
- BARAHOEI, M.; HATAMIPOUR, M. S.; AFSHARZADEH, S. CO₂ capturing by *Chlorella vulgaris* in a bubble column photo-bioreactor; effect of bubble size on CO₂ removal and growth rate. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 37, p. 9–19, 1 Apr. 2020.
- BATTAH, M. et al. Effect of Mn²⁺, Co²⁺ and H₂O₂ on biomass and lipids of the green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential candidate for biodiesel production. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 155–162, 1 Mar. 2015.
- BHATNAGAR, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends. v. 88, n. 10, p. 3425–3431, 1 Oct. 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, Aug. 1959.
- CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, n. C, p. 360–369, 2013.
- CAPORGNO, M. P. et al. Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. **Algal Research**, v. 10, p. 232–239, 1 July. 2015.
- CHEN, C.-L. et al. Biodiesel production from wet microalgae feedstock using sequential wet extraction/transesterification and direct transesterification processes. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 179–186, 1 Oct. 2015.

- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 1 May. 2007.
- CHOI, H.; LEE, S.-M. Performance of *Chlorella vulgaris* for the removal of ammonia-nitrogen from wastewater. **Environmental Engineering Research**, v. 18, 30 Dec. 2013.
- CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. **Biotechnology (Faisalabad)**, v. 3, p. 21–34, 1 Jan. 2004.
- CONVERTI, A. et al. **Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.** Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 48, n. 6, p. 1146–1151, 1 June. 2009.
- CORDEIRO, R. et al. Effects of nutritional conditions on lipid production by cyanobacteria. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, 24 July. 2017.
- DANESHVAR, E. et al. Microalgal growth and nitrate removal efficiency in different cultivation conditions: effect of macro and micronutrients and salinity. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 1848–1854, 1 Apr. 2018.
- DE MENDONÇA, H. V. et al. Microalgae-mediated bioremediation and valorization of cattle wastewater previously digested in a hybrid anaerobic reactor using a photobioreactor: comparison between batch and continuous operation. **Science of The Total Environment**, v. 633, p. 1–11, 15 Aug. 2018.
- DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: a solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3541–3547, Oct. 2011.
- DHARANI, V.; RAMAMURTHY, D. Dyeing industry effluent system as lipid production medium of *Neochloris sp.* for Biodiesel Feedstock Preparation. **BioMed research international**, v. 2014, p. 529560, 27 Aug. 2014.
- DHOTE, J.; INGOLE, S.; CHAVHAN, DR. A. Review on waste water treatment technologies. **International Journal of Engineering Research and Technology**, v. 1, 1 July. 2012.
- ELERBROCK ZORN, S. et al. Biomassa de microalgas marinhas com elevada umidade – uma avaliação positiva para extração eficiente de lipídios. **XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 1 Sept. 2018
- EZE, V. C. et al. Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. **Algal Research**, v. 32, p. 131–141, 1 June. 2018.
- FALLETTI, L. et al. Food industry wastewater treatment plant based on flotation and MBBR. **Modern Environmental Science and Engineering**, v. 1, p. 94–98, 3 July. 2015.
- FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells. v. 102, n. 1, p. 101–105, 1 Jan. 2011.
- FERREIRA, G. F. et al. A review on lipid production from microalgae: association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 109, p. 448–466, 1 July. 2019.

- FLORENCIO, F. J.; VEGA, J. M. Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*: photoproduction of ammonium. **Planta**, v. 158, n. 4, p. 288–293, Aug. 1983.
- GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 493–507, Oct. 2009.
- GUIMARÃES, D. H. P. et al. Viability of the Uses of Effluent for Cultivation of *Chlorella vulgaris* in Order to Integrate the Generation of Biofuels with the Treatment of Water. **Proceedings of the 4th Brazilian Technology Symposium (BTSym'18)**. Springer, 2019. p. 347-360. (Smart Innovation, System and Technologies, volume 40).
- JANOSZ RAJCZYK, M. Fermentation of food industry wastewater. **Water Research**, v. 27, n. 7, p. 1257–1262, 1 July. 1993.
- JIANG, Y.; YOSHIDA, T.; QUIGG, A. Photosynthetic performance, lipid production and biomass composition in response to nitrogen limitation in marine microalgae. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 54, p. 70–77, 1 May. 2012.
- KAR, D. et al. Assessment of heavy metal pollution in surface water. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, p. 119–124, 1 Dec. 2008.
- KAZBAR, A. et al. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. **Algal Research**, v. 39, p. 101432, 1 May. 2019.
- KHAN, S. et al. Biodiesel production from algae to overcome the energy crisis. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 4, p. 163–167, 1 Oct. 2017.
- KHOO, C. G.; LAM, M. K.; LEE, K. T. Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): hydrodynamics and gas–liquid mass transfer study. **Algal Research**, v. 15, p. 65–76, 1 Apr. 2016.
- KIM, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella Vulgaris*. **Tsinghua Science & Technology**, v. 15, n. 4, p. 391–396, 1 Aug. 2010.
- KONG, W.-B. et al. The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of *Chlorella vulgaris* under mixotrophic cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, 21 Sept. 2011.
- KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012–6018, Aug. 2010.
- LAM, M. K. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: growth condition and kinetic studies. **Renewable Energy**, v. 103, n. C, p. 197–207, 2017.
- LI, W.-W.; YU, H.-Q. Advances in energy-producing anaerobic biotechnologies for municipal wastewater treatment. **Engineering**, v. 2, n. 4, p. 438–446, 1 Dec. 2016.
- LI, X. et al. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 368–376, 1 Feb. 2019.

- LIU, Z.-Y.; WANG, G.-C.; ZHOU, B.-C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, Exploring Horizons in Biotechnology: A Global Venture. v. 99, n. 11, p. 4717–4722, 1 Jul. 2008.
- LÓPEZ-ROSALES, L. et al. Characterization of bubble column photobioreactors for shear-sensitive microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 1–9, 1 Mar. 2019.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. 1ed. São Carlos: Rima, 2006. 606p.
- LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. 2014. 71 p. Monografia (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- MA, Y. et al. A simple and eco-friendly method of gelatin production from bone: one-step biocatalysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 209, p. 916–926, 1 Feb. 2019.
- MAESTRINI, S. Y. et al. Ammonium thresholds for simultaneous uptake of ammonium and nitrate by oyster-pond algae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 102, n. 1, p. 75–98, 18 Nov. 1986.
- MAI, D. T.; KUNACHEVA, C.; STUCKEY, D. C. A review of posttreatment technologies for anaerobic effluents for discharge and recycling of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 48, n. 2, p. 167–209, 17 Jan. 2018.
- MANSOURI, M. Predictive modeling of biomass production by *Chlorella vulgaris* in a draft-tube airlift photobioreactor. **Advances in Environmental Technology**, v. 2, n. 3, p. 119–126, 22 Apr. 2017.
- MARIOD, A.; FADUL, H. Review: gelatin, source, extraction and industrial applications. **ACTA Scientiarum Polonorum Technol. Aliment.**, v. 12, p. 135–147, 1 June. 2013.
- MARJAKANGAS, J. M. et al. Selecting an indigenous microalgal strain for lipid production in anaerobically treated piggery wastewater. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 369–376, 1 Sept. 2015.
- MATOS, Â. et al. Teores de proteínas e lipídios de *Chlorella sp.* cultivada em concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, v. 45, p. 364–370, 1 Fev. 2015.
- MCINERNEY, M. J. Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. **Biology of anaerobic organisms**. p. 373-415. 1988
- MELO, R. G. DE et al. *Chlorella vulgaris* mixotrophic growth enhanced biomass productivity and reduced toxicity from agro-industrial by-products. **Chemosphere**, v. 204, p. 344–350, 1 Aug. 2018.
- MENEGAZZO, M. L.; FONSECA, G. G. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, p. 87–107, 1 June. 2019.
- MERA, R.; TORRES, E.; ABALDE, J. Effects of sodium sulfate on the freshwater microalga *Chlamydomonas moewusii*: implications for the optimization of algal culture media. **Journal of Phycology**, v. 52, n. 1, p. 75–88, Feb. 2016.

- MOBIN, S.; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: a review. **Energy Procedia**, RMIT University, Melbourne, Australia. v. 110, p. 510–517, 1 Mar. 2017.
- MUNDA, I. M.; HUDNIK, V. The effects of Zn, Mn, and Co accumulation on growth and chemical composition of *Fucus vesiculosus* L under different temperature and salinity conditions. **Marine Ecology**, v. 9, n. 3, p. 213–225, 1988.
- NADZIR, S. et al. Combination effect of temperature and light intensity on lipid productivity of *Tetradesmus obliquus*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1097, p. 012038, 1 Sept. 2018.
- NAGARAJAN, S. et al. An updated comprehensive techno-economic analysis of algae biodiesel. **Bioresource Technology**, Special Issue: IBS 2012 & Special Issue: IFIBiop. v. 145, p. 150–156, 1 Oct. 2013.
- NICOLAU, R.; GALERA-CUNHA, A.; LUCAS, Y. Transfer of nutrients and labile metals from the continent to the sea by a small Mediterranean river. **Chemosphere**, v. 63, n. 3, p. 469–476, 1 Apr. 2006.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4–6, p. 459–466, July. 2003.
- PALATSI, J. et al. Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: main process limitations and microbial community interactions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 2219–2227, 1 Feb. 2011.
- PARK, S.; NGUYEN, T. H. T.; JIN, E. Improving lipid production by strain development in microalgae: strategies, challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 292, p. 121953, 1 Nov. 2019.
- PISTORIUS, E. K.; FUNKHOUSER, E. A.; VOSS, H. Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. **Planta**, v. 141, n. 3, p. 279–282, 1 Jan. 1978.
- PRZYTOCKA JUSIAK, M. et al. Properties of *Chlorella vulgaris* strain adapted to high concentration of ammonium nitrogen. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 26, n. 2, p. 185–197, 1977.
- REN, H.-Y. et al. Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus sp.* by metal ions and EDTA addition. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 763–767, 1 Oct. 2014.
- RIBEIRO, D. M. et al. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, p. 100354, 27 Nov. 2019.
- RIBEIRO, R. M. **Tratamento do resíduo da indústria de gelatina através da compostagem, com emprego de serragem e palha de café.** 2007. 73 p., Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology.** Edição: 2nd ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2013.
- RITTMANN, B.; MCCARTY, P. **Environmental biotechnology: principles and applications.** 1 edition ed. Boston: McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2000.

- RUIZ, I. et al. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 60, n. 3, p. 251–258, 1 June. 1997.
- SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, 1 July. 2014.
- SÁNCHEZ MIRÓN, A. et al. Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: studies in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1015–1023, 2 Dec. 2002.
- SCHERHOLZ, M. L.; CURTIS, W. R. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. **BMC biotechnology**, v. 13, p. 39, 7 May. 2013.
- SEO, I. et al. Numerical investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation. **Biosystems Engineering**, v. 113, n. 3, p. 229–241, 1 Nov. 2012.
- SHARMA, K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies**, v. 5, p. 1532–1553, 3 May. 2012.
- SIKOSANA, M. L. et al. Municipal wastewater treatment technologies: a review. **Procedia Manufacturing**, v. 35, p. 1018–1024, 1 Jan. 2019.
- SUH, I. S.; LEE, C.-G. Photobioreactor engineering: design and performance. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, n. 6, p. 313, 1 Dec. 2003.
- SUN, N. et al. Sugar-based growth, astaxanthin accumulation and carotenogenic transcription of heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1288–1292, 1 Nov. 2008.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 45–50, 1 July. 1996.
- TAN, K. W. M.; LEE, Y. K. The dilemma for lipid productivity in green microalgae: importance of substrate provision in improving oil yield without sacrificing growth. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 255, 2016.
- TAZIKI, M. et al. Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. **Current Biotechnology**, v. 04, p. 1–1, 28 Aug. 2015.
- TISCHNER, R.; LORENZEN, H. Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. **Planta**, v. 146, n. 3, p. 287–292, 1979.
- VALDÉS, F. J. et al. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 1–6, 1 Sept. 2012.
- VEGA-ESTRADA, J. et al. *Haematococcus pluvialis* cultivation in split-cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, p. 31–5, 1 Aug. 2005.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, Biorefining: Thermochemical and Enzymatic Biomass Conversion. v. 30, n. 4, p. 904–912, 1 July. 2012.

WANG, H. et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 215–220, Jan. 2012.

WANG, H. et al. Ammonium nitrogen removal in batch cultures treating digested piggery wastewater with microalgae *Oedogonium sp.* **Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research**, v. 68, n. 2, p. 269–275, 2013.

WANG, J.-H. et al. Microalgal attachment and attached systems for biomass production and wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 331–342, 1 Sept. 2018.

WONG, Y.-K. et al. Effect of different light sources on algal biomass and lipid production in internal leds-illuminated photobioreactor. **Journal of Marine Biology and Aquaculture**, v. 2, p. 1–8, 24 Nov. 2016.

WU, Y.-H.; YU, Y.; HU, H.-Y. Effects of initial phosphorus concentration and light intensity on biomass yield per phosphorus and lipid accumulation of *Scenedesmus sp.* LX1. **BioEnergy Research**, v. 7, 5 Feb. 2014.

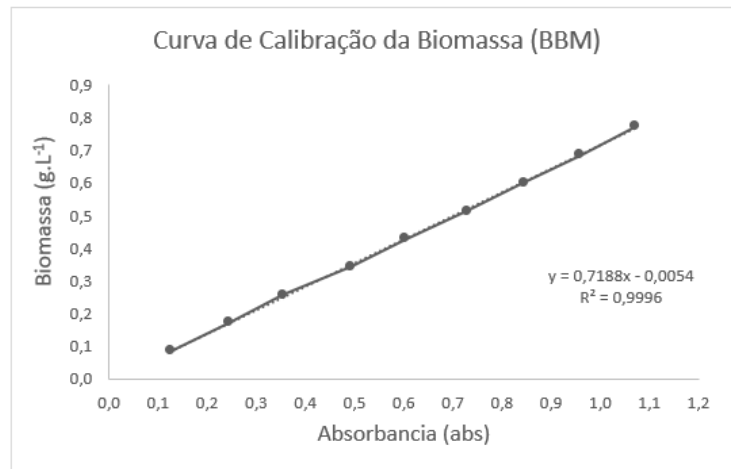
XU, L. et al. Microalgal bioreactors: challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 178–189, 1 June. 2009.

YANG, L. et al. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 40, 2018.

YU, Z. et al. The growth characteristics and biodiesel production of ten algae strains cultivated in anaerobically digested effluent from kitchen waste. **Algal Research**, v. 24, p. 265–275, 1 June. 2017.

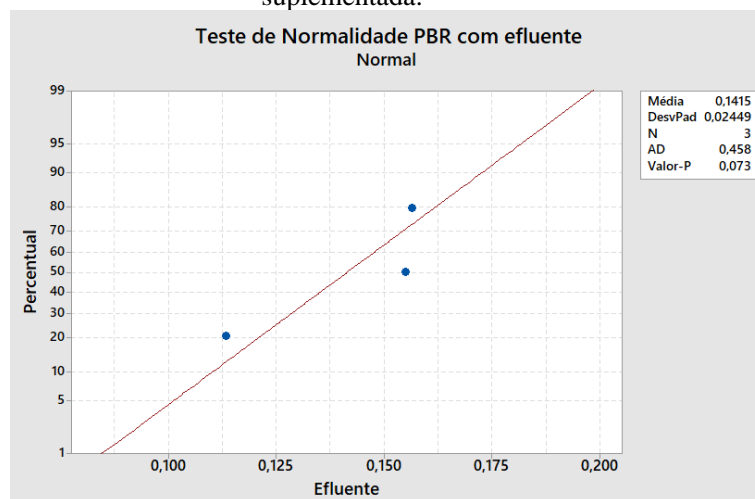
ANEXO

Figura 27: Curva de calibração da biomassa.



Fonte: Próprio autor

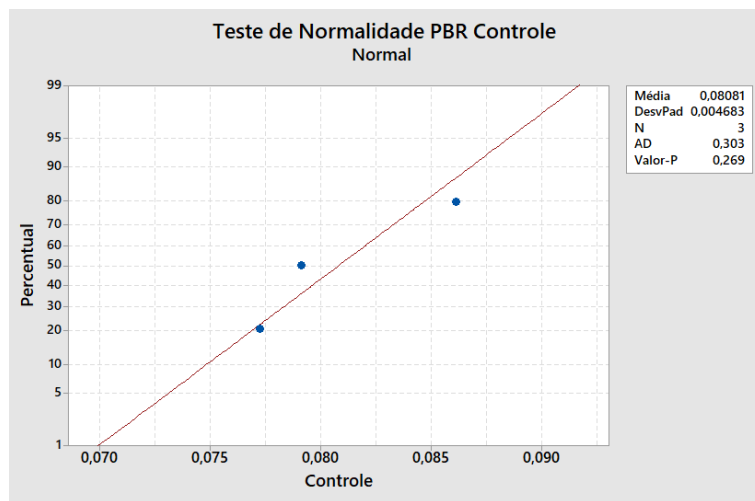
Figura 28: Teste de normalidade para os dados dos fotobiorreatores (PBRs) com água residuária suplementada.



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua – Gaussiana.

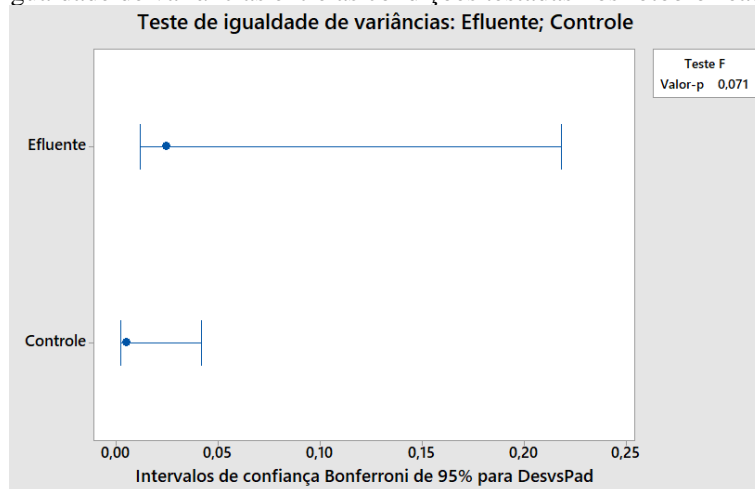
Fonte: Próprio autor.

Figura 29: Teste de normalidade para os dados dos fotobiorreatores (PBRs) com meio basal (controle).



Legenda: ■ - Dados experimentais; Linha contínua - Gaussiana.
Fonte: Próprio autor.

Figura 30: Teste de igualdade de variâncias entre as condições testadas nos fotobiorreatores (PBRs).



Fonte: Próprio autor.