



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE ERECHIM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

HELGA CRISTINA FUHRMANN DINNEBIER

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 EM DIGESTATO DA
SUINOCULTURA COM SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE NUTRIENTES E
INCREMENTO NO POTENCIAL ENERGÉTICO DE BIOGÁS**

ERECHIM | RS

2020

HELGA CRISTINA FUHRMANN DINNEBIER

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 EM DIGESTATO DA
SUINOCULTURA COM SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE NUTRIENTES E
INCREMENTO NO POTENCIAL ENERGÉTICO DE BIOGÁS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Airtton Kunz
Coorientador: Dr. Alexandre Matthiensen

ERECHIM | RS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS ERECHIM | RS

ERS 135 – Km 72, nº 200

CEP: 99.700-970

Caixa Postal 764 E

Erechim | Rio Grande do Sul | Brasil

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Dinnebier, Helga Cristina Fuhrmann
CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 EM
DIGESTATO DA SUINOCULTURA COM SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE
NUTRIENTES E INCREMENTO NO POTENCIAL ENERGÉTICO DE
BIOGÁS / Helga Cristina Fuhrmann Dinnebier. -- 2020.
56 f.:il.

Orientador: Doutor em Química Airtton Kunz
Co-orientadora: PhD em Ciências Biológicas Alexandre
Matthiensen
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental, Erechim, RS, 2020.

1. Fitorremediação. 2. Biocombustível. 3. Biomassa.
4. Otimização de Processos. 5. Microalgas. I. Kunz,
Airtton, orient. II. Matthiensen, Alexandre, co-orient.
III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

HELGA CRISTINA FUHRMANN DINNEBIER

**CULTIVO DE *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 EM DIGESTATO DA
SUINOCULTURA COM SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE NUTRIENTES E
INCREMENTO NO POTENCIAL ENERGÉTICO DE BIOGÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Airton Kunz

Coorientador: Dr. Alexandre Matthiensen.

Defendido em banca examinadora em: 31/03/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Airton Kunz
Orientador/Presidente – UFFS



Dr. Alexandre Matthiensen
Coorientador – Embrapa Suínos e Aves



Prof. Dra. Helen Treichel
Membro Titular Interno – UFFS



Dr. Ricardo Luis Radis Steinmetz
Membro Titular Externo – Embrapa Suínos e Aves

AGRADECIMENTOS

Enquanto escrevo, a frase “*Quem estará nas trincheiras ao teu lado? E isso importa? Mais do que a própria guerra* (Ernest Hemingway)” nunca fez tanto sentido. Em tempos de desmonte da ciência no Brasil, sou muito privilegiada por conviver e aprender com profissionais tão competentes e inspiradores. Hora de agradecer e, acima de tudo, reconhecer que nada seria possível sem vocês.

Primeiro ao meu maior incentivador, Maikon, que abraçou os meus sonhos e aspirou junto. Por acordar inúmeras vezes às 4h da manhã pra me levar até na rodoviária, faça chuva, faça sol, faça -1°C ou 21°C. Por fazer desse caminho mais leve e pelo amor, que sempre foi muito.

Especialmente à minha família. Meus pais Irlene Fuhrmann e Darci Dinnebier, meu irmão Eduardo, minhas raízes. Marli, Carlos e Cami, minha segunda família. Minha total gratidão e amor à vocês!

Ao meu orientador Dr. Airton Kunz, a quem tenho profunda admiração e respeito. Sou grata por todos os questionamentos que me deixaram incomodada e me fizeram buscar mais e pela enorme contribuição com meu aprendizado.

Ao meu coorientador Dr. Alexandre Matthiensen, quem me orienta desde a graduação e me introduziu no mundo das microalgas. Sou imensamente grata por todo conhecimento e suporte durante esses anos.

À prof. Dra. Helen Treichel e ao Dr. Ricardo Radis Steinmetz, membros da banca, por todas as contribuições e reflexões pertinentes na qualificação e defesa dessa dissertação.

À Dra. Fabiane Antes e aos colegas do LAFQ e grupo LEAA: Alice, Ana, Anderson, Bruno, Deisi, Duda, Gabi, João, Rafael, Renata, Taís, Tauani e William. Obrigada pela ajuda nas análises e atividades de laboratório, bem como pelo suporte técnico que colaboraram para minha formação. Sem a ajuda de vocês seria muito mais difícil dar conta do recado.

À prof. Solange Sprandel da Silva, prof. Cristiane Zucchi e à Rosangela Triques que me deram todo subsídio durante esses dois anos.

Às minhas amigas Tauani, Paula e Elaine por tudo. O mundo é sim um lugar melhor porque existem pessoas como vocês.

À todos os colegas e professores do PPGCTA, em especial à Manu e Rafaela, pela amizade.

Por fim, à Embrapa Suínos e Aves pelo aporte técnico e financeiro para realização dessa pesquisa.

“Ensinaaram-me que o caminho do progresso não é rápido, nem fácil”.

(Marie Curie)

Esta dissertação está estruturada na forma de introdução geral com referencial teórico e um capítulo na forma de artigo.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA E SIMULTÂNEA FICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES	14
1.2 OBJETIVO GERAL	22
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
2. ARTIGO: ALTA PRODUTIVIDADE DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> LBA#39 E SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM DIGESTATO DA SUINOCULTURA COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIACAL	29
2.1 INTRODUÇÃO	31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.2.1 INÓCULO	33
2.2.2 DIGESTATO COMO MEIO DE CULTURA PARA MICROALGAS	33
2.2.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	34
2.2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
2.2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	34
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.3.1 DIGESTATO COMO MEIO DE CULTURA	37
2.3.2 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAT E DO pH NA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA	38
2.3.3 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS	46
2.4 CONCLUSÕES	50
2.5 AGRADECIMENTOS	51
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Especificação relativa (%) de dióxido de carbono (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) na água em função do pH.....	19
Figura 2 – Esquema representando a assimilação de nitrogênio inorgânico.....	20
Figura 3 – Equilíbrio de dissociação das formas de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) em meio aquoso a 25 °C.	20
Figura 4 – Distribuição de espécies de fósforo solúvel em função do pH.	22
Figura 5 – Cepa <i>Chlorella sorokiniana</i> LBA39: a) aumento 40x; b) aumento 100x.....	33
Figura 6 – Superfície de resposta e curva de contorno para as variáveis independentes pH e concentração de NAT ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e resultado de produtividade microalgal de <i>C. sorokiniana</i> LBA#39.	39
Figura 7 – Crescimento de <i>C. sorokiniana</i> LBA#39 em digestato da suinocultura (A) Sem controle de pH e com diluições do digestato a 25, 35, 45, 55 e 65 (% v·v ⁻¹) e (B) Com controle de pH entre 7-7,5 com concentrações de NAT de 800, 900, 1000 e 1300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	41
Figura 8 – Mecanismos de remoção de NAT da fração líquida do digestato possíveis de serem observados durante o crescimento das microalgas.	43
Figura 9 – Produção cumulativa de biogás por conteúdo volátil de sólidos usando biomassa de <i>C. sorokiniana</i> LBA#39 cultivada em digestato da suinocultura em comparação aos controles (inóculo e celulose).....	47
Figura 10 – Simulação de cenários em que o cenário 1 compreende a monodigestão de dejetos suíno de uma unidade de produção hipotética; o Cenário 2 mostra o potencial da codigestão de dejetos suíno com biomassa de <i>C. sorokiniana</i> LBA#39 e o Cenário 3 considera um cenário de codigestão simulando uma escala piloto.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das condições de cultivo de microalgas do gênero <i>Chlorella</i> sp.....	16
Tabela 2 – Caracterização do meio de cultura BG11 em relação ao digestato da suinocultura.	37
Tabela 3 – Respostas de produtividade de biomassa, remoção de NAT, N total e fosfato dos cultivos sob diferentes condições.	38
Tabela 4 – Respostas de produtividade de biomassa, remoção de NAT, N total e fosfato para os experimentos complementares.	40
Tabela 5 – Produtividade e rendimento de biomassa do gênero <i>Chlorella</i> sp. sob diferentes meios de cultura.	42
Tabela 6 – Resultados de remoção de NAT, N e P solúvel.	43
Tabela 7 – Resultados de amônia livre (AL) e produtividade média calculada para diferentes concentrações de NAT sob diferentes pH.	44
Tabela 8 – Produção de biogás de outras espécies de microalgas crescidas em diferentes meios de cultura.	47

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil destaca-se como quarto maior produtor e exportador de carne suína, com uma produção anual de 3,97 milhões de toneladas, indicando a suinocultura como uma importante atividade econômica para o país. Em nível nacional, a atividade está presente em todas as regiões, mas predomina na Região Sul com destaque para o Estado de Santa Catarina com a maior produção (27,90%) e exportação (51,12%) (ABPA, 2019). Em vista disso, a produção de carne suína no Brasil apresentou importantes transformações nos últimos anos, como o aumento da escala de produção e a implementação dos sistemas de produção de animais em confinamento (SPACs) nas unidades produtoras, que intensificou o desafio de gerenciar uma grande quantidade de efluentes utilizando métodos convencionais.

Dessa forma, apesar de sua importância econômica, a suinocultura gera grandes quantidades de efluentes (KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009), caracterizados principalmente pela presença de sólidos, matéria orgânica e nutrientes potencializadores da eutrofização dos ecossistemas aquáticos (PALHARES, 2011; SUZIN et al., 2018; VIANCELLI et al., 2015b) e patógenos entéricos, que podem trazer consequências sérias para saúde humana e ambiental (FONGARO et al., 2018; VIANCELLI et al., 2015a). Além disso, podem apresentar elevadas concentrações de antibióticos e hormônios, fato que também corrobora com a resistência de bactérias e vírus a antibióticos (CHENG et al., 2018; STEINMETZ; GRESSLER, 2019).

Dentre as alternativas tecnológicas utilizadas para o tratamento de efluentes da suinocultura, a digestão anaeróbia vem se consolidando no sul do Brasil, especialmente pelo seu potencial energético (biogás), baixo custo e fácil operacionalização de biodigestores de lagoa coberta – BLC (DO AMARAL et al., 2016; TÁPPARO et al., 2019). A digestão anaeróbia caracteriza-se como um processo metabólico complexo e ocorre pela ação de três principais grupos de microrganismos (acidogênicos, acetogênicos e metanogênicos), que consomem a matéria orgânica biodegradável do substrato em etapas sequenciais, resultando em dois principais produtos: o biogás, com vasto potencial de aplicação energética e o digestato, que por sua vez, é rico em nitrogênio e fósforo, impedindo seu lançamento em corpos hídricos sem outros processos de polimento (AQUINO; CHERNICHARO, 2005; KUNZ; STEINMETZ; AMARAL, 2019).

Por conseguinte, o aproveitamento do digestato pode ocorrer pelo uso externo (doação ou comercialização para terceiros) e/ou uso interno (na unidade de produção). Ou seja, dependendo das suas características, o digestato apresenta potencial biofertilizante. Recentemente, um estudo mostrou que o digestato é utilizado como fertilizante por 82% das plantas de biogás consultadas no sul do Brasil, sendo que a comercialização é uma prática pouco observada, em que apenas 3% geram receita com o digestato (MARTINEZ; BÜHRING; MÜLLER, 2019). Diante desse cenário, tendo em vista as inúmeras oportunidades vinculadas ao manejo correto do digestato, à redução de custos e à viabilidade econômica em plantas de biogás, destaca-se a possibilidade de integrar digestão anaeróbia ao cultivo de microalgas, em que o digestato pode ser utilizado como meio de cultivo para produção de biomassa microalgal com alto valor agregado (MARQUES et al., 2013).

A demanda por cadeias de produção alternativas no setor energético é crescente para reduzir a dependência do petróleo e mitigar as mudanças climáticas (UGGETTI et al., 2014) e o cultivo de microalgas representa uma alternativa promissora na produção de biocombustíveis de terceira geração, especialmente em função do acúmulo de substâncias de reserva energética em suas células (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017; JANKOWSKA; SAHU; OLESKOWICZ-POPIEL, 2017). Logo, a produção de biogás consiste em uma fonte versátil de energia renovável, pois o metano pode ser usado para a geração de calor, energia e como combustível para veículos, sendo a mais rentável tecnologia de bioconversão implementada em todo o mundo para produção comercial de eletricidade, calor e gás natural comprimido (GNV) a partir de materiais orgânicos (MATHERI et al., 2017; WEILAND, 2010).

A composição do biogás consiste principalmente de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), sendo que o substrato utilizado, a tecnologia de fermentação e o método de coleta podem afetar a produção e a composição do biogás bruto. Em estudo, foi relatado que o conteúdo de metano no biogás aumentou notavelmente de 60% para 92% utilizando a microalga *Scenedesmus* sp. com conteúdo lipídico de 27,6% p/p de peso seco celular (SRINUANPAN et al., 2017) e após utilizar como estratégia o aumento gradual de CO_2 disponível no meio de cultura, aumentou o teor lipídico da biomassa para 34,1% p/p de peso seco de células e conseqüentemente aumentou o teor de metano no biogás (~98%) (SRINUANPAN; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2018).

Além de CH_4 e CO_2 , o biogás bruto também contém gases traços como amônia (NH_3), sulfeto de hidrogênio (H_2S), hidrogênio (H_2), oxigênio (O_2), nitrogênio (N_2) e monóxido de carbono (CO) (SUN et al., 2015). Todavia, a aplicabilidade comercial do biogás é

estritamente dependente da capacidade de produção de CH₄ e da remoção de CO₂ e outros gases traços que podem ter impactos negativos no sistema de utilização, como corrosão, aumento de emissões e riscos para a saúde humana (RYCKEBOSCH; DROUILLON; VERVAEREN, 2011; SUN et al., 2015).

O crescimento de microalgas autotróficas requer dióxido de carbono, sugerindo que as microalgas podem capturar CO₂ a partir do biogás e, em seguida, o conteúdo de metano pode ser aumentado quando o biogás é alimentado para a cultura de microalgas (SRINUANPAN et al., 2017). Sabe-se que em condições favoráveis, as microalgas como *Chlorella* sp, *Scenedesmus* sp. e *Chlorella sorokoniana* possuem potencial de remoção de CO₂ e H₂S do biogás bruto, o primeiro pela fixação e o segundo, resultante do processo de oxidação de H₂S para SO₄ como consequência da alta concentração de O₂ (MEIER et al., 2018; PRANDINI et al., 2016), embora o H₂S possa ser um composto inibidor do crescimento de *Chlorella* sp. (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; POSTEN, 2017). Dessa forma, as microalgas podem atuar na purificação do biogás bruto, além de agregar o conceito de economia circular aplicada ao processo de digestão anaeróbia.

O conceito de economia circular, por sua vez, vem ganhando força desde o final da década de 1970, havendo um crescimento exponencial de publicações sobre o tópico nos últimos anos: cerca de 670 publicações sobre o tema em 2019, em comparação com 24 publicações em 2014 (GEISSDOERFER et al., 2017). Após extensa revisão da literatura, visando clarear, distinguir e sintetizar a relação entre os termos economia circular e Sustentabilidade, Geissdoerfer et al. (2017) definiram economia circular como “*um sistema regenerativo no qual a entrada de recursos e o desperdício, a emissão e o vazamento de energia são minimizados diminuindo, fechando e estreitando os loops de material e energia*”. Os autores ainda sugerem que isso pode ser alcançado por meio de projeto, manutenção, reparo, reutilização, remanufatura, reforma e reciclagem de longa duração.

Sob outra perspectiva, Kirchherr; Reike e Hekkert (2017) realizaram uma análise abrangente e sistemática de 114 definições de Economia Circular, tendo em vista que uma variedade de entendimentos pode resultar no colapso do conceito ou em um impasse conceitual. Os resultados apontam que a economia circular é frequentemente descrita como uma combinação de atividades de redução, reutilização e reciclagem. Além disso, as definições mostram como principal objetivo da economia circular a prosperidade econômica, seguido pela qualidade ambiental e seu impacto na equidade social e nas gerações futuras ainda é pouco mencionado.

Desse modo, a integração de processos biológicos como uma solução de economia circular aplicada ao gerenciamento de efluentes da suinocultura torna-se interessante. Nesse cenário, o dejetos bruto é tratado pela digestão anaeróbia produzindo energia renovável, enquanto o digestato é utilizado para o crescimento de microalgas e simultânea remoção de nutrientes. A biomassa de microalgas resultante pode então retornar ao biodigestor para somar na produção de biogás ou ser convertida em outros produtos de alto valor agregado (CHENG et al., 2020; STILES et al., 2018). Recentemente, o conceito de biorrefinaria para microalgas também vem sendo exaustivamente estudado para aumentar a viabilidade econômica do cultivo em grande escala. Neste caso, todos os componentes da biomassa precisam ser valorizados, exigindo uma biorrefinaria de vários produtos como compostos químicos, bioenergia e biocombustíveis (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017).

1.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA E SIMULTÂNEA FICORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES

As microalgas, em sua diversidade, são organismos unicelulares com dimensões entre 1 e 10 μm , amplamente distribuídas, sendo encontradas tanto em ambientes úmidos terrestres quanto em ambientes aquáticos de água doce, salobra e salgada. Dentre os tipos básicos de microalgas existem as cianobactérias, que são organismos com estrutura interna simplificada com organelas desprovidas de membranas (organismos procariontes), e as microalgas propriamente ditas, organismos com maior complexidade estrutural, apresentando estruturas delimitadas por membranas (eucariontes) (FRANCESCHINI et al., 2010).

Dentre as diferentes espécies de microalgas, o gênero *Chlorella* sp. possui capacidade relevante de acumular grandes quantidades de lipídios e proteínas, tendo várias aplicações comerciais (MONDAL et al., 2017). A espécie *Chlorella sorokiniana*, é capaz de apresentar altas taxas de crescimento em culturas densas, sob diversas condições de luminosidade e com alta capacidade de acumular carboidratos (MURWANASHYAKA et al., 2017). Além disso, a espécie é capaz de crescer em temperaturas de 28 a 40 °C, entre 45 e 1032 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, sendo que intensidade de luz superior a 2500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ indicou estresse e limitou a taxa de crescimento específico (LI et al., 2013).

A produtividade, composição química e consequente aplicação comercial da biomassa microalgal é estritamente dependente da espécie, das condições ambientais favoráveis de temperatura, luminosidade, agitação, pH e da composição do meio de cultura, disponibilidade

de nutrientes e ausência de compostos inibitórios ou tóxicos (CHENG et al., 2019). A adaptação de microalgas a diferentes regimes de crescimento, geralmente requer períodos de aclimação. Assim, a identificação de microalgas robustas e de rápido crescimento é uma prioridade de pesquisa. A Tabela 1 apresenta uma seleção de estudos que usaram espécies de *Chlorella sp.*, cultivadas em diferentes condições e meios de cultivo que obtiveram diferentes respostas de produtividade, rendimento e taxas de reprodução das microalgas.

Tabela 1 – Resumo das condições de cultivo de microalgas do gênero *Chlorella* sp..

Espécie / linhagem ou cepa	Inóculo	Meio de crescimento	Agitação	Luminosidade / fotoperíodo	Temperatura	pH	Biomassa	Referência
<i>C. sorokiniana</i>	~ 0,12 g·L ⁻¹	Sintético	Manual (2x/d)	Contínua (~ 1000 lux)	25±2°C	-	-	BABU et al., 2017
<i>C. sorokiniana</i>	0,6×10 ⁶ cel·mL ⁻¹	Sintético	Orbital (140 rpm)	Contínua (60 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	27±2°C	-	-	PALACIOS et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i>	0,5 mg·L ⁻¹	Sintético	Manual (1x/d)	Contínua Lâmpadas fluorescentes	24±2°C	-	Taxa de crescimento: 1,021± 0,089 d ⁻¹	GATIDOU et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i>	100 mg·L ⁻¹	Sintético	Inserção contínua de CO ₂	Contínua Lâmpadas fluorescentes (250 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹)	30°C±2	-	Rendimento de biomassa: 1,3 a 2,6 g·L ⁻¹	AMOA et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> <i>UTEX 1230</i>	-	Sintético	2% de CO ₂ (v/v)	Contínua 100 μE·m ⁻² ·s ⁻¹	30°C	6,5-7,0	-	LEITE et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> <i>IAM-212</i>	-	-	Aeração + 5% de CO ₂ (v/v)	Lâmpadas fluorescentes 200- 500 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ Fotoperíodo 12h:12h	-	6,0	-	UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007
<i>C. sorokiniana</i> <i>GXNN01</i>	-	Sintético + glucose	Orbital (150 rpm)	Autotrófico 80 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹	30±2°C	-	-	QIAO; WANG, 2009
<i>C. sorokiniana</i>	OD _{750nm} = 0,2	-	Aeração	LEDs 200 μmol·m ⁻² ·s ⁻¹ Fotoperíodo: 16h:8h	37±0,5°C	7,0±0,3	Taxa de crescimento Autotrófico: 0,65±0,053 d ⁻¹ Mixotrófico: 1,62±0,14 d ⁻¹	VAN WAGENEN; DE FRANCISCI; ANGELIDAKI , 2015
<i>C. sorokiniana</i>	-	Sintético + glucose	Orbital (150 rpm)	Heterotrófico	37°C	6,1	Rendimento de biomassa:	LI et al., 2013

							37,6 g·L ⁻¹ Produtividade máx. de biomassa: 12,2 g·L ⁻¹ ·d ⁻¹	
<i>C. sorokiniana</i>	-	-	Aeração	LED cor vermelha 0 e 3000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	37°C	6,7	-	CUARESMA et al., 2009
<i>C. sorokiniana</i>	-	Sintético (M-8a)	Aeração	Luz vermelha 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	-	6,7	-	CUARESMA FRANCO et al., 2012
<i>C. vulgaris</i>	5×10^4 cel·mL ⁻¹	Vinhaça não esterilizada	-	150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Fotoperíodo 12h:12h	24±2°C	6,8-7,0	Taxa de crescimento: 1,5-1,6 d ⁻¹	CANDIDO; LOMBARDI, 2018
<i>Chlorella spp.</i>	70 mg·L ⁻¹ 30% v·v ⁻¹	Digestato suíno não esterilizado	Sem agitação ou aeração	Natural Variação: 321.5 ± 411.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	31.7±16.3°C	-	Rendimento de biomassa: 0,3–0,4 g·L ⁻¹	MICHELON et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> 211-8k	20% v·v ⁻¹	Águas residuárias municipais e da suinocultura	Aeração	196 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ Fotoperíodo: 16h:8h	30°C	-	Rendimento de biomassa: 1 g·L ⁻¹	LEITE; HOFFMANN; DANIEL, 2019

Embora recentemente pesquisas tenham avançado no uso de resíduos como meio de cultura, muitos estudos ainda envolvem a produção de microalgas em meios de cultura sintéticos. Uma das vantagens do uso de águas residuárias no cultivo de microalgas em relação aos métodos convencionais de tratamento, é que, além de remover N e P, esses nutrientes são reciclados em uma biomassa que pode ser convertida em energia e outros produtos.

Além de N e P, o carbono é essencial para o crescimento das microalgas. O carbono pode ser assimilado pelas microalgas na forma de CO₂, mediante atividade fotossintética em sistemas autotróficos, fontes orgânicas de carbono em sistemas heterotróficos ou carbono orgânico e inorgânico de forma simultânea em processos mixotróficos (NIRMALAKHANDAN et al., 2019). Algumas pesquisas apontam a condição mixotrófica como ideal no crescimento da *Chlorella sorokiniana* para a produção de biomassa rica em lipídios (LI et al., 2016; ZHENG et al., 2012).

O efeito de acetato, glicose, metanol e sacarose como substratos de carbono orgânico em três espécies de microalgas (*C. globosa*, *C. minutissima* e *S. bijuga*) foi estudado e os resultados mostram a sacarose e a glicose como fonte de carbono externo adequada em sistemas mixotróficos. Geralmente a glicose é a fonte de carbono orgânica preferida pelas microalgas, porém seu uso compete com a produção de alimentos (BHATNAGAR et al., 2011), tornando bem-vindas alternativas mais baratas, como resíduos agroindustriais.

A razão N:P também é considerada um fator-chave para o controle do conteúdo lipídico nas microalgas (CHU et al., 2014; RASHID et al., 2014; XIN et al., 2010). Estudos demonstraram mudanças importantes na composição celular das microalgas como o aumento da concentração de lipídios em função da limitação nutricional de N e P, sendo que esse efeito varia entre as espécies (MICHELON et al., 2016; SRINUANPAN; CHEIRSILP; PRASERTSAN, 2018; WANG; LAN, 2018)

Carbono

O carbono inorgânico dissolvido na água pode ser encontrado nas formas de CO₂, bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃⁻²), e sua especiação é em função do pH do meio (Figura 1).

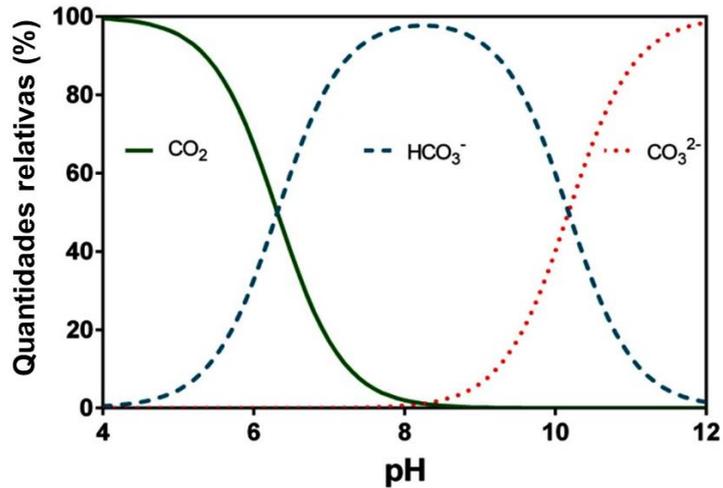


Figura 1 – Especiação relativa (%) de dióxido de carbono (CO₂), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) na água em função do pH.

Fonte: PEDERSEN; COLMER; SAND-JENSEN, 2013.

Nas faixas de pH entre 7,0 e 9,0 o HCO₃⁻ é a espécie predominante, que pode ser utilizado pelas microalgas como fonte de carbono inorgânico adicional para fotossíntese, enquanto em pH ≥10,0 a espécie prevalente é CO₃²⁻, aparentemente não absorvido por organismos autotróficos. Abaixo de pH 6,0 a maior parte do carbono inorgânico dissolvido está presente como CO₂, mais prontamente disponível para fotossíntese aquática (CHI; O'FALLON; CHEN, 2011; PEDERSEN; COLMER; SAND-JENSEN, 2013).

A concentração ótima de CO₂ varia entre as espécies de microalgas, pois o processo de fotossíntese pode ser limitado nas microalgas pela baixa concentração de CO₂ junto à intensidade luminosa disponibilizada, ou seja, a elevação na concentração de CO₂ resulta na intensificação da fotossíntese. Deste modo, a injeção de CO₂ em culturas de algas é uma prática conhecida e difundida para aumentar a produção da biomassa microalgal (ACIÉN FERNÁNDEZ et al., 2012; XIE et al., 2018).

Nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente essencial para o crescimento das microalgas, sendo um integrante-chave de muitos componentes celulares como alcalóides, amidas, aminoácidos, proteínas, DNA, RNA, enzimas e vitaminas. A maioria das microalgas são capazes de utilizar uma variedade de fontes de nitrogênio, incluindo o nitrogênio orgânico (ureia, glicina, glutamina, peptona, extrato de levedura, etc.) e nitrogênio inorgânico (amônia, nitrato e nitrito) (ZHOU; SCHUBERT, 2016).

Microalgas podem assimilar nitrogênio inorgânico nas formas de amônio, nitrito e nitrato, embora a fonte preferida é o nitrogênio amoniacal (NH₃+ NH₄⁺), uma vez que a

assimilação não requer a reação redox, consumindo menos energia (CAI; PARK; LI, 2013; JIA; YUAN, 2016; ZHOU; SCHUBERT, 2016). Conforme mostra a Figura 2, todas as formas de nitrogênio inorgânico são reduzidas a amônio antes de serem incorporadas aos aminoácidos da membrana plasmática. A reação ocorre quando nitrato e nitrito sofrem redução com o auxílio de enzimas nitrato redutase e nitrito redutase respectivamente, e utilizando glutamato (Glu) e adenosina trifosfato (ATP), a glutamina sintetase facilita a incorporação de amônio no aminoácido glutamina (CAI; PARK; LI, 2013).

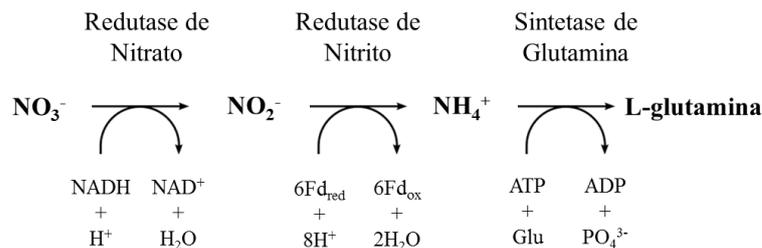


Figura 2 – Esquema representando a assimilação de nitrogênio inorgânico.
Fonte: CAI; PARK; LI, 2013.

Nitrogênio amoniacal total (NAT) é a soma das formas $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ dissolvidas no meio líquido e seu equilíbrio depende da temperatura e do pH no sistema (Equação 1; Figura 3), sabendo que em pH 9,2 ambas espécies estão presentes. Assim, conforme aumenta o pH o equilíbrio químico é deslocado para NH_3 (KUNZ; MUKHTAR, 2016).

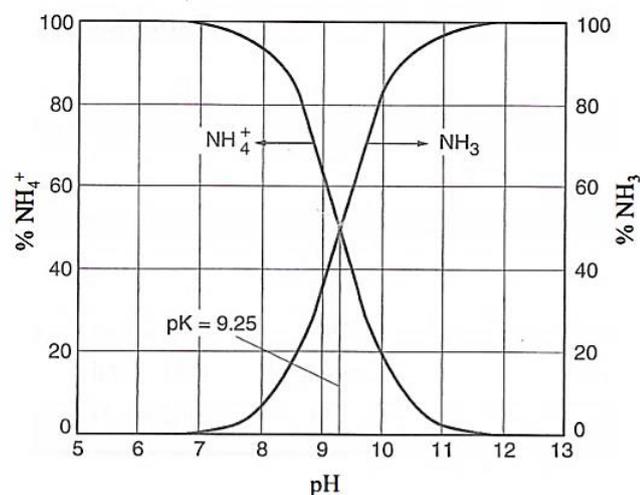


Figura 3 – Equilíbrio de dissociação das formas de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) em meio aquoso a 25 °C.
Fonte: KUNZ; MUKHTAR, 2016.

Microalgas do gênero *Chlorella* sp. absorvem NH_4^+ por vários transportadores de alta ou baixa afinidade, como Amt (transportador de amônia), enquanto NH_3 por ser uma molécula neutra, pode se difundir livremente através da membrana celular (NAGARAJAN et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020). Por esse motivo, quando o equilíbrio químico de NAT é deslocado para NH_3 no meio aquoso pode haver inibição no crescimento celular das microalgas, uma vez que a amônia livre (NH_3) é considerada tóxica para a maioria dos organismos aquáticos (NOKKAEW et al., 2013).

Embora não haja concentração limite fixa de amônia livre para evitar uma possível toxicidade, que pode variar entre as espécies, algumas pesquisas observaram inibição no crescimento de diferentes espécies de microalgas e condições de cultivo. Níveis entre 2 e 34 $\text{mg}_{\text{NH}_3}\cdot\text{L}^{-1}$ reduziram em 77% a velocidade de crescimento de *Scenedesmus* sp. (UGGETTI et al., 2014) e em culturas de *Chlorella vulgaris* houve efeito inibitório com concentração entre 20 e 250 $\text{mg NH}_3\cdot\text{L}^{-1}$ (TAM; WONG, 1996). Também foi relatada inibição na fotossíntese e no crescimento de *Scenedesmus obliquus* com concentração inicial de amônia de 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ou 34 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ em $\text{pH} \geq 8,0$ (ABELIOVICH; AZOV, 1976).

Além disso, também pode ser observada a perda de amônia livre na forma gasosa durante o processo de fitorremediação, onde quantidades expressivas podem ser volatilizadas com o aumento do pH e da temperatura (KUNZ; MUKHTAR, 2016).

Fósforo

O fósforo também é um nutriente essencial no metabolismo das microalgas, desempenhando um papel importante no crescimento e desenvolvimento das células. É um elemento que pode muitas vezes limitar o crescimento microalgal, isso porque o fósforo é facilmente ligado a outros íons (por exemplo, cálcio e ferro), resultando na sua precipitação, tornando este nutriente indisponível para absorção (CAI; PARK; LI, 2013).

O fósforo pode estar presente na água na forma dissolvida ou particulada, sendo que a quantificação de ambos resulta na estimativa de fósforo total. A forma dissolvida consiste em fósforo inorgânico e orgânico, e em ecossistemas naturais, os fosfatos são as principais formas encontradas. Em função do pH, os fosfatos podem ocorrer de três formas diferentes conforme mostrado na Figura 4.

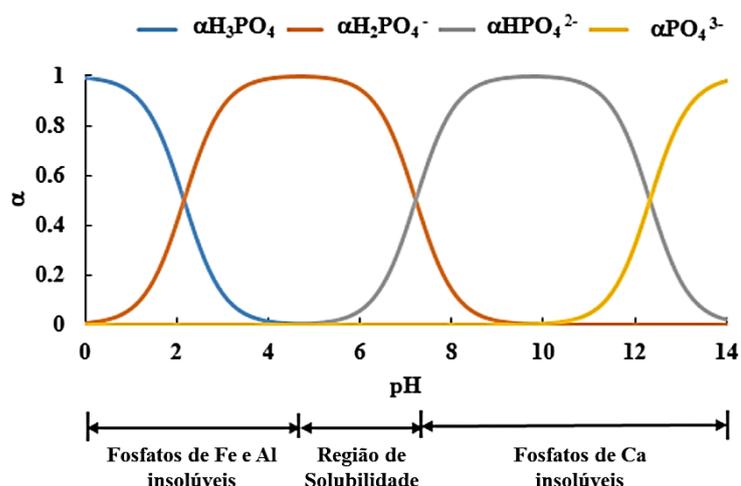


Figura 4 – Distribuição de espécies de fósforo solúvel em função do pH.
 Fonte: Azam et al., 2019.

Entre pH 4,0 e 6,0 a forma mais comum é o H_2PO_4^- . Em pH entre 7,0 e 12,0 o HPO_4^{2-} é a forma predominante e acima de pH 12,5 o ortofósforo (PO_4^{3-}) é predominante (AZAM et al., 2019). As microalgas absorvem fósforo como ortofosfato inorgânico, preferencialmente nas formas de H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-} (LARS DOTTER, 2006).

1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral dessa dissertação foi explorar o uso do digestato da suinocultura como meio de cultura para cepa *Chlorella sorokiniana* | LBA#39, integrando o processo de digestão anaeróbia com o conceito de economia circular. Os resultados obtidos poderão servir de subsídio para ampliar o cultivo de microalgas utilizando digestato, mitigar a emissão de GEE e melhorar a produção de biogás no atual cenário da suinocultura.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801–806, 1 jun. 1976.

ABPA. Relatório Anual. **Associação Brasileira Proteína Animal**, 2019.

ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G. et al. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 577–586, 26 nov. 2012.

AMOAHA, J. et al. 5-Hydroxymethylfurfural production from salt-induced photoautotrophically cultivated *Chlorella sorokiniana*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, p. 117–123, fev. 2019.

AQUINO, S. F. DE; CHERNICHARO, C. A. L. Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 152–161, jun. 2005.

AZAM, H. M. et al. Phosphorous in the environment: characteristics with distribution and effects, removal mechanisms, treatment technologies, and factors affecting recovery as minerals in natural and engineered systems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 20183–20207, 22 jul. 2019.

BABU, A. G. et al. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. **Algal Research**, v. 23, p. 178–185, abr. 2017.

BHATNAGAR, A. et al. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3425–3431, out. 2011.

BRASIL, B. S. A. .; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, out. 2017.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, mar. 2013.

CANDIDO, C.; LOMBARDI, A. T. The physiology of *Chlorella vulgaris* grown in conventional and biodigested treated vinasses. **Algal Research**, v. 30, p. 79–85, mar. 2018.

CHENG, D. L. et al. Bioprocessing for elimination antibiotics and hormones from swine wastewater. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 1664–1682, abr. 2018.

CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 109–122, 1 mar. 2019.

CHENG, H.-H. et al. Recent advancement on biological technologies and strategies for resource recovery from swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122861, maio 2020.

CHI, Z.; O'FALLON, J. V; CHEN, S. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 537–541, nov. 2011.

CHU, F.-F. et al. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 241–246, jan. 2014.

CUARESMA FRANCO, M. et al. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 693–699, 7 ago. 2012.

CUARESMA, M. et al. Productivity of *Chlorella sorokiniana* in a short light-path (SLP) panel photobioreactor under high irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 2, p. 352–359, 1 out. 2009.

DO AMARAL, A. C. et al. Influence of solid–liquid separation strategy on biogas yield from a stratified swine production system. **Journal of Environmental Management**, v. 168, p. 229–235, mar. 2016.

FONGARO, G. et al. Evaluation of the Effective Inactivation of Enteric Bacteria and Viruses From Swine Effluent and Sludge at Tropical Temperatures. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 7, p. 226, 22 jul. 2018.

FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre, RS: Artmed Editora, 2010.

GATIDOU, G. et al. Growth inhibition and fate of benzotriazoles in *Chlorella sorokiniana* cultures. **Science of The Total Environment**, v. 663, p. 580–586, maio 2019.

GEISSDOERFER, M. et al. The Circular Economy – A new sustainability paradigm? **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 757–768, fev. 2017.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; POSTEN, C. Fate of H₂S during the cultivation of *Chlorella* sp. deployed for biogas upgrading. **Journal of Environmental Management**, v. 191, p. 252–257, abr. 2017.

JANKOWSKA, E.; SAHU, A. K.; OLESKOWICZ-POPIEL, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 75, p. 692–709, ago. 2017.

JIA, H.; YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, v. 2, n. 1, 29 dez. 2016.

KIRCHHERR, J.; REIKE, D.; HEKKERT, M. Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 127, p. 221–232, dez. 2017.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5485–5489, nov. 2009.

KUNZ, A.; MUKHTAR, S. HYDROPHOBIC MEMBRANE TECHNOLOGY FOR AMMONIA EXTRACTION FROM WASTEWATERS. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 2, p. 377–386, abr. 2016.

KUNZ, A.; STEINMETZ, R. L. R.; AMARAL, A. C. DO. **Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás e tratamento do digestato**. Concórdia/SC: [s.n.].

LARSDOTTER, K. **Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate**. [s.l: s.n.].

LEITE, L. DE S. et al. Interference of model wastewater components with flocculation of *Chlorella sorokiniana* induced by calcium phosphate precipitates. **Bioresource Technology**, v. 286, p. 121352, ago. 2019.

LEITE, L. DE S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, p. 100821, out. 2019.

LI, T. et al. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 60–67, mar. 2013.

LI, T. et al. Assessment of photosynthesis regulation in mixotrophically cultured microalga *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 19, p. 30–38, nov. 2016.

MARQUES, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1933–1943, 7 dez. 2013.

MARTINEZ, D. G.; BÜHRING, G. M. B.; MÜLLER, R. **Panorama de tecnologias aplicadas no agronegócio de biogás e biometano**. Foz do Iguaçu/PR: [s.n.].

MATHERI, A. N. et al. Optimising biogas production from anaerobic co-digestion of chicken manure and organic fraction of municipal solid waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 756–764, dez. 2017.

MEIER, L. et al. Removal of H₂S by a continuous microalgae-based photosynthetic biogas upgrading process. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 119, p. 65–68, out. 2018.

MICHELON, W. et al. Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 7, p. 1407–1419, 22 abr. 2016.

MICHELON, W. et al. Residual sugar from microalgae biomass harvested from phycoremediation of swine wastewater digestate. **Water Science and Technology**, v. 79, n. 11, p. 2203–2210, 1 jun. 2019.

MONDAL, M. et al. Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. **Energy Conversion and Management**, v. 145, p. 247–254, ago. 2017.

MURWANASHYAKA, T. et al. Kinetic and transcriptional exploration of *Chlorella sorokiniana* in heterotrophic cultivation for nutrients removal from wastewaters. **Algal Research**, v. 24, p. 467–476, jun. 2017.

NAGARAJAN, D. et al. Current advances in biological swine wastewater treatment using

microalgae-based processes. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121718, out. 2019.

NIRMALAKHANDAN, N. et al. Algal wastewater treatment: Photoautotrophic vs. mixotrophic processes. **Algal Research**, v. 41, p. 101569, ago. 2019.

NOKKAEW, A. et al. AMMONIA UPTAKE BY UNICELLULAR GREEN MICROALGAE: MATHEMATICAL MODELING AND PARAMETER OPTIMIZATION. **Southeast Asian Journal of Sciences**, v. 2, n. 1, p. 41–51, 2013.

PALACIOS, O. A. et al. Early Changes in Nutritional Conditions Affect Formation of Synthetic Mutualism Between *Chlorella sorokiniana* and the Bacterium *Azospirillum brasilense*. **Microbial Ecology**, v. 77, n. 4, p. 980–992, 5 maio 2019.

PALHARES, J. C. P. Pegada hídrica dos suínos abatidos nos Estados da Região Centro-Sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, n. 3, 8 jun. 2011.

PEDERSEN, O.; COLMER, T. D.; SAND-JENSEN, K. Underwater Photosynthesis of Submerged Plants – Recent Advances and Methods. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, 2013.

PRANDINI, J. M. et al. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67–75, fev. 2016.

QIAO, H.; WANG, G. Effect of carbon source on growth and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana* GXNN01. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 4, p. 762–768, 4 nov. 2009.

RASHID, N. et al. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 760–778, dez. 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**, v. 9, p. 100354, fev. 2020.

RYCKEBOSCH, E.; DROUILLON, M.; VERVAEREN, H. Techniques for transformation of biogas to biomethane. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1633–1645, maio 2011.

SRINUANPAN, S. et al. Strategies to improve methane content in biogas by cultivation of oleaginous microalgae and the evaluation of fuel properties of the microalgal lipids. **Renewable Energy**, v. 113, p. 1229–1241, dez. 2017.

SRINUANPAN, S.; CHEIRSILP, B.; PRASERTSAN, P. Effective biogas upgrading and production of biodiesel feedstocks by strategic cultivation of oleaginous microalgae. **Energy**, v. 148, p. 766–774, abr. 2018.

STEINMETZ, R. L. R.; GRESSLER, V. Impact of Antibiotics on Biogas Production. In: [s.l: s.n.]. p. 181–198.

STILES, W. A. V. et al. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 732–742, nov. 2018.

- SUN, Q. et al. Selection of appropriate biogas upgrading technology-a review of biogas cleaning, upgrading and utilisation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 521–532, nov. 2015.
- SUZIN, L. et al. Chemical Removal of Phosphorus from Swine Effluent: the Impact of Previous Effluent Treatment Technologies on Process Efficiency. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 11, p. 341, 20 nov. 2018.
- 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, jul. 1996.
- TÁPPARO, D. C. et al. Sanitary effectiveness and biogas yield by anaerobic co-digestion of swine carcasses and manure. **Environmental Technology**, v. 41, n. 6, p. 682–690, 7 mar. 2019.
- UGGETTI, E. et al. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 437–443, 1 jan. 2014.
- UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, v. 45, n. 2, p. 309–311, jun. 2007.
- VAN WAGENEN, J.; DE FRANCISCI, D.; ANGELIDAKI, I. Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 5, p. 1775–1782, 24 out. 2015.
- VIANCELLI, A. et al. Pathogen Inactivation and the Chemical Removal of Phosphorus from Swine Wastewater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 8, p. 263, 16 ago. 2015a.
- VIANCELLI, A. et al. Microbiological quality and genotoxic potential of surface water located above the Guarani aquifer. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, n. 7, p. 5517–5523, 28 out. 2015b.
- WANG, C.; LAN, C. Q. Effects of shear stress on microalgae – A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 4, p. 986–1002, jul. 2018.
- WEILAND, P. Biogas production: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 849–860, 24 jan. 2010.
- XIE, M. et al. Optimization of *Chlorella sorokiniana* cultivation condition for simultaneous enhanced biomass and lipid production via CO₂ fixation. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 15–20, 1 jun. 2018.
- XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5494–5500, jul. 2010.
- ZHENG, H. et al. Harvesting of microalgae by flocculation with poly (γ -glutamic acid). **Bioresource Technology**, v. 112, p. 212–220, maio 2012.

ZHOU, W.; SCHUBERT, T. Potential Applications of Microalgae in Wastewater Treatments.
In: VASCONCELOS, J. R. et al. (Eds.). . **Recent Advances in Microalgal Biotechnology**.
[s.l.] OMICS International, 2016.

2. ARTIGO: ALTA PRODUTIVIDADE DE *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 E SIMULTÂNEA REMOÇÃO DE NUTRIENTES EM DIGESTATO DA SUINOCULTURA COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAICAL

RESUMO

A demanda global por mitigar o efeito das mudanças climáticas e minimizar a dependência excessiva dos combustíveis fósseis destaca o uso das microalgas para remediar digestato da suinocultura e produzir biomassa de valor agregado, tornando atraente um cenário de economia circular aplicado ao processo de digestão anaeróbia. Entretanto, ainda existem desafios no uso de digestato como meio de cultura, que inclui a variação da sua composição e o controle da toxicidade por amônia livre (NH_3) na célula das microalgas, desencadeado pela alta concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) no digestato. Nesse contexto, objetivou-se (i) investigar o uso do digestato da suinocultura como meio de cultura para microalgas, bem como a remoção simultânea de nutrientes da fração líquida e (ii) avaliar o potencial de produção de biogás da biomassa de microalgas integrado à suinocultura no contexto da economia circular. Para isso, a cepa da microalga *C. sorokiniana* | LBA#39 foi utilizada como inóculo na execução dos experimentos e as amostras de digestato foram coletadas no sistema de tratamento de uma granja comercial de produção de leitões. A metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 foi aplicada para avaliar os efeitos da concentração de NAT e do pH nas respostas de produtividade de biomassa e remoção de nutrientes. A melhor condição de cultivo foi replicada e a biomassa resultante foi caracterizada e usada para avaliar o Potencial Bioquímico de Biogás (PBB). Por fim, foram simulados cenários visando avaliar o potencial de produção de biogás da suinocultura integrando as microalgas ao processo. Os resultados mostraram o uso de digestato suíno para produção de biomassa de microalgas e simultâneo polimento torna-se uma alternativa promissora e na análise estatística dos dados, a variável independente concentração de NAT apresentou efeito significativo positivo, enquanto a variável pH apresentou efeito significativo negativo para as respostas produtividade de biomassa e remoção de fosfatos. Isso significa que, quanto maior a concentração de NAT e menor o pH, maiores serão as respostas. Dessa forma, a cepa *C. sorokiniana* | LBA#39 conseguiu tolerar altas concentrações de NAT ($\leq 1300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em pH neutro (pH 7,0-7,5), obtendo alta produtividade de biomassa ($198,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) e satisfatória remoção de fosfato ($\leq 90\%$) e nitrogênio ($\leq 70\%$). A biomassa colhida após fitorremediação do digestato apresentou alto teor de sólidos voláteis (95,4%) e proteínas (59,5%). O potencial bioquímico de biogás da monodigestão de microalgas foi de $392 \pm 14 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$ ($\text{CH}_4 = 65\%$) e os cenários da integração do cultivo de microalgas com a digestão anaeróbia resultaram em um potencial de incrementar até 31,2% na produção de biogás de uma granja de produção de leitões. Essa é uma abordagem atraente para integração de matéria-prima às instalações agroindustriais já existentes inserindo o conceito de economia circular, bem como mitigar as emissões de GEE e melhorar a produção de biogás e a viabilidade econômica do sistema de geração de energia no atual cenário do agronegócio.

Palavras-chave: Economia Circular. Fitorremediação. Biocombustível. Biomassa. Otimização de Processos.

ARTICLE: HIGH PRODUCTIVITY OF *Chlorella Sorokiniana* | LBA#39 BIOMASS WITH NUTRIENTS SIMULTANEOUS REMOVAL FROM SWINE WASTEWATER WITH HIGH AMMONIA CONCENTRATION

ABSTRACT

The global demand for mitigating the effect of climate change and minimizing excessive dependence on fossil fuels highlights the microalgae use to remedy swine digestate and produce value-added biomass, making a circular economy scenario applied to the anaerobic digestion process attractive. However, there are still challenges in the digestate use as a culture medium, which includes varying its composition and controlling toxicity by free ammonia (NH_3) in the microalgae cell, triggered by the high total ammoniacal nitrogen (NAT) concentration in the digestate. In this context, the objective was (i) to investigate the swine digestate use as a culture medium for microalgae, as well as the simultaneous nutrients removal from the liquid fraction and (ii) to evaluate the biogas production potential of microalgae biomass integrated with pig farming in the circular economy context. For this, the strain of microalgae *C. sorokiniana* | LBA # 39 was used as an inoculum in the experiments execution and the digestate samples were collected in the treatment a commercial piglet production farm system. The NAT concentration effects and pH effects on the biomass productivity responses and nutrient removal different evaluated through statistical planning using a central rotational composite design (CRCD) 2^2 . The best cultivation condition replicated and the resulting biomass characterized and used to evaluate the Biogas Biochemical Potential (BBP). Finally, scenarios simulated in order to evaluate the biogas production potential of swine farming by integrating microalgae into the process. The results showed the swine digestate use for the production of microalgae biomass and simultaneous polishing becomes a promising alternative. In the data statistical analysis, the independent variable NAT concentration had a significant positive effect, while the pH variable had a significant negative effect for the responses of biomass productivity and phosphate removal. This means that the higher the NAT concentration and the lower the pH, the greater the responses. Thus, *C. sorokiniana* | LBA # 39 was able to tolerate high NAT concentrations ($\leq 1300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) at neutral pH (pH 7.0-7.5), obtaining high biomass productivity ($198.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and satisfactory phosphate removal ($\leq 90\%$) and nitrogen ($\leq 70\%$). The biomass harvested after digestion phytoremediation showed a high content of volatile solids (95.4%) and proteins (59.5%). The biochemical biogas potential from microalgae monodigestion was $392 \pm 14 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$ ($\text{CH}_4 = 65\%$) and the scenarios of the integration of microalgae cultivation with anaerobic digestion resulted in a potential to increase up to 31.2% in the biogas production from a swine production farm. This is an attractive approach for integrating raw materials into existing agro-industrial facilities, introducing the circular economy concept, as well as mitigating GHG emissions and improving biogas production and the economic viability of the power generation system in the agribusiness current scenario.

Key-works: Circular Economy. Remediation. Biofuel. Biomass. Process Optimization.

2.1 INTRODUÇÃO

Há uma crescente demanda global por mitigar o efeito das mudanças climáticas e minimizar a dependência excessiva das fontes fósseis tradicionais. Nesse cenário, a produção de biomassa microalgal como matéria-prima para produção de biocombustíveis de terceira geração, representa uma alternativa promissora com inúmeras vantagens ambientais e econômicas (CHEN; ZHAO; QI, 2015; MEDIPALLY et al., 2015; REMPEL et al., 2019), com destaque para redução das emissões de gases de efeito estufa (GEE); crescimento rápido e alta produtividade de biomassa (10 a 100 vezes maior que culturas terrestres); colheita contínua sem competir com a produção de alimentos (BRASIL; SILVA; SIQUEIRA, 2017) e o potencial de remediar efluentes e resíduos agroindustriais (OSUNDEKO et al., 2019).

Várias pesquisas investigam o gênero *Chlorella* sp., sendo que seu cultivo comercial em grande escala foi iniciado nos anos 60 no Japão (MILLEDGE, 2011). Desde então, espécies deste gênero são amplamente utilizadas para produção de nutracêuticos e cosméticos; extração de pigmentos, bioquímicos, antioxidantes e polímeros para aplicações médicas e industriais; aditivos para alimentos e rações; na síntese de drogas antimicrobianas, antivirais e anticancerígenas; biofertilizante e na produção de biocombustíveis como biodiesel, bioetanol e biogás (KOUTRA et al., 2018; RIZWAN et al., 2018).

Dentre as espécies relatadas para o gênero, *Chlorella sorokiniana* foi indicada como promissora para processos e aplicações de biotecnologia pela Aliança Nacional para Biocombustíveis e Bioprodutos Avançados (RIBEIRO et al., 2020). A espécie também apresenta uma qualidade robusta de crescer em temperaturas entre 28 e 40 °C e intensidade luminosa entre 45 e 1032 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, com alta capacidade de se aclimatar às condições artificiais, além de produzir biomassa rica em proteínas, carboidratos e lipídios sob uma variedade de condições (CUARESMA FRANCO et al., 2012; DE-BASHAN et al., 2008; LI et al., 2013; QIU et al., 2017; ZHENG et al., 2013).

Todavia, a expansão da produção de microalgas em escala real apresenta alguns desafios para tornar o processo economicamente viável, como o desenvolvimento de meios de cultura padronizados e de baixo custo. Somando esse desafio à oportunidade de agregar valor ao gerenciamento dos efluentes da suinocultura no sul do Brasil, que tem sua geração intensificada pelo crescimento da produção e implementação dos sistemas de produção de animais em confinamento – SPACs (produção anual de carne suína = 3,97 mi ton) (ABPA, 2019), destaca-se a possibilidade de integrar o cultivo de microalgas ao processo de digestão anaeróbia. A digestão anaeróbia tem sido amplamente difundida como uma tecnologia

consolidada na valorização de dejetos suíno, resultando na produção de biogás e geração de digestato, subproduto rico em nitrogênio e fósforo (AMARAL et al., 2014; KUNZ; MIELE; STEINMETZ, 2009; RIBEIRO et al., 2020; TÁPPARO et al., 2019). Nesse contexto, seria possível reciclar o digestato como meio de cultura no crescimento das microalgas (PERAZZOLI et al., 2016) e impactar positivamente na viabilidade econômica desses empreendimentos. Essa vantagem torna-se ainda mais interessante ao introduzir o conceito de economia circular ao processo, quando a biomassa resultante do tratamento do digestato retorna como substrato ao biodigestor, agregando na produção de biogás (MARQUES et al., 2013; MOLINUEVO-SALCES et al., 2016; STILES et al., 2018).

O cultivo de microalgas do gênero *Chlorella* para fitorremediação de efluentes da suinocultura já foi relatado anteriormente como sustentável, barato e eficiente para produção de biomassa (CHEN et al., 2020; MICHELON et al., 2019), no entanto, ainda existem desafios que incluem a falta de estabilização no conteúdo de macro e micronutrientes e o controle da toxicidade por amônia livre (NH_3) no crescimento celular das microalgas, uma vez que nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) é a principal forma de nitrogênio inorgânico presente nesses efluentes (NAGARAJAN et al., 2019). A concentração de amônia livre durante o cultivo das microalgas é dependente da concentração inicial de nitrogênio amoniacal total (NAT) no efluente, bem como do pH e da temperatura. Assim, geralmente esse efeito tóxico pode ser controlado pela diluição dos efluentes (XIA; MURPHY, 2016) ou ajustando o pH do meio (AYRE; MOHEIMANI; BOROWITZKA, 2017), frisando que fatores ambientais como pH podem ser manipulados e afetar diretamente o crescimento de microalgas, permitindo o sucesso do escalonamento e a aplicação ambiental e comercial da biomassa.

Dessa forma, os objetivos desse estudo foram (i) investigar o uso do digestato da suinocultura como meio de cultura não esterilizado para microalgas, bem como a remoção simultânea de nutrientes da fração líquida do digestato e (ii) avaliar o potencial de produção de biogás da biomassa de microalgas integrado à suinocultura no contexto da economia circular.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 INÓCULO

A cepa *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 (Figura 5), isolada com 98,8% de identidade de sequência de *rbcL* para *Chlorella sorokiniana* (HADI et al., 2016), foi utilizada como inóculo. O inóculo estoque foi mantido em meio sintético Blue Green 11 – BG11 (STANIER et al., 1971), em incubadora com intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ advinda de lâmpadas de LEDs, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (RIBEIRO et al., 2020). A predominância da espécie no inóculo foi aferida por análise microscópica (Eclipse E200 - Nikon) (PRANDINI et al., 2016).

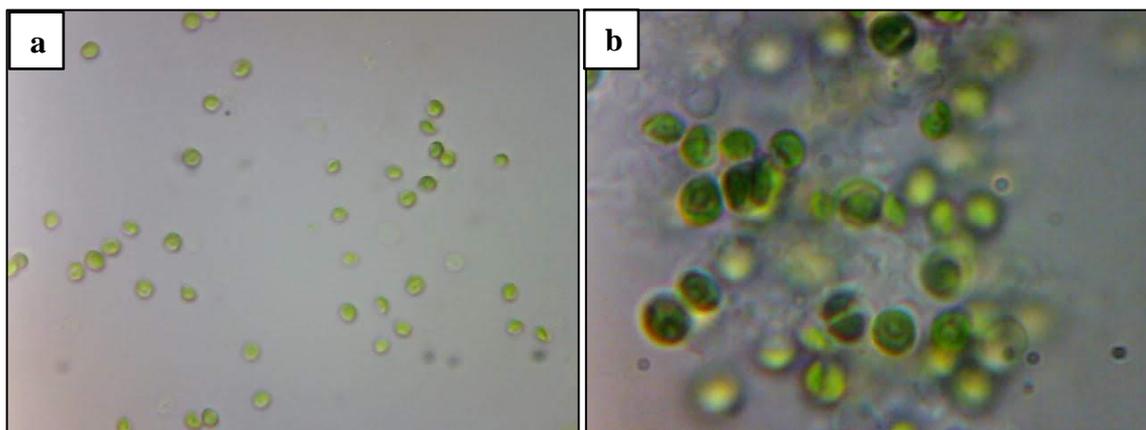


Figura 5 – Cepa *Chlorella sorokiniana* LBA39: a) aumento 40x; b) aumento 100x.

2.2.2 DIGESTATO COMO MEIO DE CULTURA PARA MICROALGAS

As amostras de digestato foram obtidas no sistema de tratamento de granja comercial de produção de leitões localizada em Videira/SC ($27^\circ 2' 35.3''\text{S}$, $51^\circ 5' 33.7''\text{W}$ – Brasil). A granja possui capacidade de alojamento de 10.000 matrizes e o sistema de tratamento recebe diariamente cerca 200 m^3 dos dejetos produzidos. A coleta foi efetuada na saída de um biodigestor tipo lagoa coberta (BLC) com tempo de retenção hidráulico (TRH) entre 22 a 25 dias. Antes de ingressar no BLC o dejetos de suíno produzido na granja sofre remoção de sólidos por peneira ($d \leq 2 \text{ mm}$) de escovas rotativas seguida de decantação (TRH 2h).

2.2.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

A partir de resultados preliminares, os experimentos foram configurados em escala de laboratório, conduzidos em fotobiorreatores de 1 L, alimentação em batelada, contendo 10% de inóculo ($v \cdot v^{-1}$) com concentração de $\sim 1,2 \times 10^7$ cel $\cdot mL^{-1}$. O pH foi monitorado e ajustado ($NaHCO_3$ $0,13 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, Na_2CO_3 $1,0 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ e HCl $1,0 \text{ mol} \cdot L^{-1}$) manualmente uma vez ao dia. Os reatores foram mantidos sob iluminação constante fornecida por lâmpadas de LEDs com intensidade luminosa média de $99 \mu\text{mol} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, temperatura de 25 ± 1 °C e agitação orbital contínua a 500 rpm (IKA *Color Squid White*) (HOLDMANN et al., 2018; RIBEIRO et al., 2020). Os experimentos foram monitorados diariamente para temperatura (°C) e pH (HANNA instruments HI8424).

2.2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 foi escolhida para determinar a influência das variáveis pH e concentração de nitrogênio amoniacal total (NAT) nas respostas de produtividade de biomassa microalgal e remoção de nutrientes da fração líquida do digestato (RODRIGUES; IEMMA, 2014). A metodologia de planejamento de experimentos aplicada é válida somente para os intervalos adotados, sendo pH entre 6,6 e 9,4 e concentração de NAT entre 118 e 682 $mg \cdot L^{-1}$. Os efeitos estimados das variáveis e os coeficientes de regressão dos modelos gerados foram calculados, bem como as repostas obtidas foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). O tratamento estatístico foi realizado utilizando o software STATISTICA 8.0 (STATSOFT, versão de teste).

2.2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

O digestato e o BG11 foram caracterizados quanto ao pH (instrumentos HANNA HI8424), a alcalinidade determinada como $CaCO_3$ (Modelo 848 Titrino plus, Metrohm, Herisau, Suíça), fósforo total, Na, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn determinados por espectrometria de emissão óptica de plasma ICP-OES (Optima 8300, Perkin Elmer, EUA), carbono orgânico total e nitrogênio determinados usando um analisador de TOC (TOC-LCPH

/ CPN, Shimadzu, Kyoto, Japão) e nitrogênio amoniacal total NAT ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), Nitrito N-NO_2^- , Nitrato N-NO_3^- - determinado pelo Sistema de Análise de Injeção de Fluxo FIALab 2500 (FIALab Instruments, EUA).

O crescimento das microalgas foi monitorado e determinado por ensaios gravimétricos (APHA, 2012), utilizando-se frascos de 2,0 mL tipo Eppendorf pré-secos. As análises foram realizadas em triplicata e as amostras centrifugadas a $3000 \times g$ por 10 min (D3024R, Scilogex, USA), secas em estufa a 45°C por 5 h para obtenção do peso seco ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (adaptado de WANG; CURTIS, 2016).

O sobrenadante resultante foi utilizado para análises de NAT ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), N-NO_2^- , N-NO_3^- determinados pelo Sistema de Análise de Injeção de Fluxo FIALab 2500 (FIALab Instruments, EUA) e o fósforo solúvel foi medido como fósforo após filtração em filtro $0,45 \mu\text{m}$ (ICP-OES Optima 8300 Perkin Elmer, USA).

A produtividade média de biomassa microalgal foi calculada conforme a Equação 2:

$$\text{Produtividade média (mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = \frac{(X_t - X_0)}{(t_x - t_0)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde X_0 e X_t foram as concentrações de biomassa seca ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo inicial (t_0) e após n dias (t_x), respectivamente.

A amônia livre foi calculada de acordo com a Equação 3 (ANTHONISEN et al., 1976):

$$\text{Amônia livre (NH}_3, \text{mg} \cdot \text{L}) = \frac{17}{14} \times \frac{[\text{NAT}] \times 10^{\text{pH}}}{E^{\left[\frac{6344}{273+T(^{\circ}\text{C})}\right]} + 10^{\text{pH}}} \quad (\text{Equação 3})$$

A remoção de nutrientes foi calculada, segundo a Equação 4 (KIMURA et al., 2019):

$$\text{Remoção de nutrientes R (\%)} = 100 \times \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde C_i e C_f são concentrações de N ou P nos dias inicial e final do período experimental, respectivamente.

A biomassa de microalgas colhida foi seca em estufa a 105°C por 5 horas (PERAZZOLI et al., 2016) para caracterização. Os sólidos voláteis e cinzas foram medidos por ensaios de gravimetria (APHA, 2012). Para determinação de lipídios foi utilizado o método oficial AOCS Am 5-04 (AOCS, 2013) e o teor de proteínas foi determinado em um analisador de nitrogênio Leco FP-528 em que resultou em $\text{N} \times 6,25$ (LECO Corporation,

EUA) (AOCS, 1995); e carboidrato foi estimado pela diferença no teor de lipídios, proteínas e cinzas em relação ao peso total da biomassa (BI; HE, 2013).

2.2.5.1 Potencial de produção de biogás

2.2.5.1.1 Cultivo e caracterização do substrato

A biomassa para uso nos ensaios de digestão anaeróbia foi obtida pelo cultivo de *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 conforme descrito no item 2.2.3, em fotobiorreatores de 12 L, em triplicada, utilizando digestato com concentração de $1400 \text{ mg}_{\text{NAT}} \cdot \text{L}^{-1}$ e o pH foi ajustado para 7,0-7,5. A biomassa microalgal foi separada por centrifugação (DPR-6000, Damon/IEC Division, USA).

2.2.5.1.2 Potencial bioquímico de biogás – PBB

Os experimentos de PBB foram conduzidos em batelada e triplicata em eudiômetros de 500 mL acoplados em reatores de 250 mL. Os reatores foram aclimatados em temperatura mesofílica $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, conforme especificado na diretriz alemã VDI 4630 (VDI, 2006). O inóculo utilizado foi coletado em um reator anaeróbio aclimatado em condições mesofílicas (STEINMETZ et al., 2016) e a relação de sólidos voláteis entre a biomassa microalgal e o inóculo foi $\leq 0,5$ (VDI, 2006). A composição do biogás foi avaliada com auxílio de analisador portátil BIOGAS5000 (Geotech, UK).

2.2.5.1.3 Cenários

Foram simulados três cenários visando avaliar o potencial de produção de biogás da suinocultura incluindo o cultivo de microalgas ao processo.

Cenário 1: No cálculo do potencial de produção de biogás da monodigestão de dejetos suínos foi considerado o volume de $22,8 \text{ L}_{\text{DEJETO}} \cdot \text{matriz}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ com teor de sólidos voláteis de $10,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de uma Unidade de Produção de Leitões (UPL) hipotética de 1.000 matrizes multiplicado pelo potencial bioquímico de biogás de $326 \text{ mL}_{\text{N}} \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$ (Amaral et al, 2016).

Cenário 2: Para calcular o potencial de codigestão de dejetos suínos com biomassa de microalgas foram utilizados os resultados de rendimento de biomassa microalgal

considerando os resultados desse trabalho, o volume de digestato gerado na granja e a concentração de sólidos voláteis multiplicado pelo PBB.

Cenário 3: Para calcular um cenário tecnicamente possível, foi considerado um sistema de cultivo de lagoa tipo “*raceway*” com dimensões de 12 m X 2,8 m X 0,4 m, com volume útil aproximado de 10 m³, o que leva a uma área cultivada de 33,6 m².

O potencial de geração de energia foi calculado assumindo que 1 m³ de biogás com aproximadamente 60% de CH₄ equivale a 2 kWh de energia elétrica (HASAN; BAHAUDDIN, 2012).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 DIGESTATO COMO MEIO DE CULTURA

A caracterização físico-química do digestato coletado em comparação ao meio sintético BG11 (STANIER et al., 1971) é apresentada na Tabela 2. Observa-se que a composição do digestato é semelhante ao BG11 para a maioria dos componentes, com exceção de K, COT, alcalinidade e N total, que são entre 5 e 7 vezes mais concentrados.

Tabela 2 – Caracterização do meio de cultura BG11 em relação ao digestato da suinocultura.

Parâmetro	Unidade de medida	Meio sintético BG11	Digestato coletado
pH	-	6	8
Alcalinidade	mgCaCO ₃ · L ⁻¹	20	4691
Carbono Orgânico Total (COT)	mg · L ⁻¹	18	218
Nitrogênio Amoniacal Total (NAT)	mg · L ⁻¹	-	1245 ± 235
Nitrito (N-NO ₂)	mg · L ⁻¹	-	ND
Nitrato (N-NO ₃)	mg · L ⁻¹	375	ND
Nitrogênio Total (NT)	mg · L ⁻¹	375	1184
K	mg · L ⁻¹	126	654
P	mg · L ⁻¹	10	28 ± 7
Ca	mg · L ⁻¹	15	28
Mg	mg · L ⁻¹	8	18
Cu	mg · L ⁻¹	1	1
Zn	mg · L ⁻¹	1	3
Fe	mg · L ⁻¹	16	11
Mn	mg · L ⁻¹	0	ND
Na	mg · L ⁻¹	201	199

*ND = não detectado.

Os macronutrientes mais importantes para o crescimento das microalgas incluem carbono, nitrogênio e fósforo, sendo que as águas residuárias de suínos são tipicamente ricas em nitrogênio inorgânico, principalmente amoniacal e fósforo (NAGARAJAN et al., 2019).

Na maioria dos meios de cultura sintéticos e a exemplo do BG11, os sais de nitrato de sódio e fosfatos são as únicas fontes de nitrogênio e fósforo. Considerando a composição, o uso de digestato da suinocultura é uma alternativa promissora para redução de custos no escalonamento do cultivo de microalgas.

Dessa forma, foram avaliados os parâmetros de NAT e P total monitorados por quinze (15) meses consecutivos (junho de 2018 a agosto de 2019) e os resultados mostraram que a relação N:P se manteve relativamente estável durante o período amostral, fator fundamental para viabilizar o uso do digestato como meio de cultura para microalgas. A razão estequiométrica mínima do digestato foi registrada no inverno 6N:1P, considerando NAT e P total, enquanto a relação máxima no verão 12N:1P. A estequiometria difundida para o crescimento de microalgas corresponde a razão molar 106C/16N/1P (REDFIELD, 1958), embora essa proporção não seja fixa e pode variar entre as espécies de microalgas, particularmente as de água doce. Essa flexibilidade das microalgas pode garantir o sucesso do uso do digestato como meio de cultura para produção de biomassa, removendo N e P da fração líquida simultaneamente.

2.3.2 EFEITO DO pH E DA CONCENTRAÇÃO DE NAT

Considerando o digestato utilizado (Tabela 2), a concentração ótima no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* | LBA#39 foi investigada seguindo um DCCR 2² que totalizou onze experimentos, cuja matriz com os valores reais e codificados para as variáveis independentes (concentração de NAT e pH) e as respectivas respostas são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Respostas de produtividade de biomassa, remoção de NAT, N total e fosfato dos cultivos sob diferentes condições.

Experimento	NAT (mg · L ⁻¹)	pH	Produtividade (mg · L ⁻¹ · d ⁻¹)	Remoção de NAT (%)	Remoção de N total (%)	Remoção de Fosfatos (%)
M1	-1 (200)	-1 (7,0)	63	26	26	94
M2	1 (600)	-1 (7,0)	103	23	22	89
M3	-1 (200)	1 (9,0)	20	21	20	15
M4	1 (600)	1 (9,0)	33	26	15	71
M5	0 (400)	0 (8,0)	84	22	21	91
M6	0 (400)	0 (8,0)	89	25	23	92
M7	0 (400)	0 (8,0)	87	39	36	92
M8	-1,41 (118)	0 (8,0)	40	19	19	96
M9	1,41 (682)	0 (8,0)	136	37	34	85
M10	0 (400)	-1,41 (6,6)	81	24	24	96
M11	0 (400)	1,41 (9,4)	15	16	16	51

Na análise estatística dos dados, a variável independente concentração de NAT apresentou efeito significativo positivo, enquanto a variável independente pH apresentou efeito significativo negativo para as respostas produtividade de biomassa e remoção de fosfatos. Isso significa que quanto maior a concentração de NAT e menor o pH, maiores serão as respostas.

2.3.2.1 Biomassa microalgal

A Equação 5 apresenta o modelo matemático obtido para a resposta produtividade de biomassa, validado com 95% de confiança pela ANOVA, com coeficiente de correlação de 0,91235 e teste F calculado (10,4) maior que o F tabelado (5,67).

$$\text{Produtividade média (mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}) = 86,9 + (23,6 \times C_{\text{NAT}}) + (-2,76 \times C_{\text{NAT}}) + (-25,89 \times \text{pH}) + (-22,88 \times \text{pH}^2) + (-6,66 \times \text{pH} \times C_{\text{NAT}}) \quad (\text{Equação 5})$$

A superfície de resposta e a curva de contorno (Figura 6) foram elaboradas após a validação do modelo matemático, comprovando que a produtividade de biomassa microalgal foi favorecida com a maior concentração de NAT ($\geq 682,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e com o pH $\leq 8,0$.

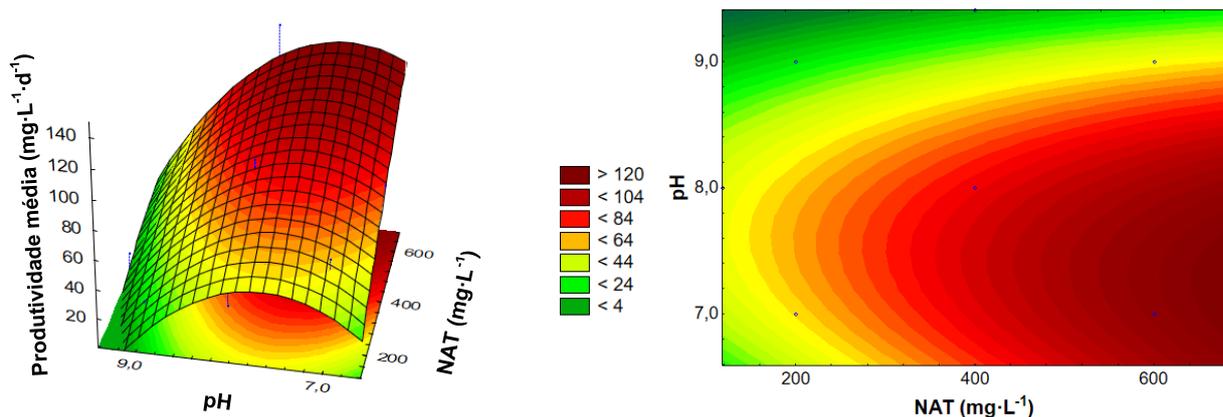


Figura 6 – Superfície de resposta e curva de contorno para as variáveis independentes pH e concentração de NAT ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e resultado de produtividade microalgal de *C. sorokiniana* | LBA#39.

Além disso, importante ressaltar que o aumento da produtividade em maiores concentrações de NAT em pH neutro pode ser correlacionado com o equilíbrio químico deslocado para NH_4^+ no meio líquido, ou seja, a fonte de NAT predominante no meio líquido

em $\text{pH} \leq 9,25$ é NH_4^+ , diminuindo o potencial risco de toxicidade nas células das microalgas por NH_3 (DE PRÁ et al., 2012; KUNZ; MUKHTAR, 2016; NOKKAEW et al., 2013).

Após análise das respostas de produtividade de biomassa e remoção de nutrientes, que instigaram aumentar a concentração de NAT em pH ajustado (7,0-7,5) para avaliar melhorias na produtividade de biomassa, foram realizados quatro experimentos adicionais apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Respostas de produtividade de biomassa, remoção de NAT, N total e fosfato para os experimentos complementares.

Experimento	NAT ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	Produtividade ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
M12	800	7,0-7,5	140
M13	900	7,0-7,5	160
M14	1000	7,0-7,5	198
M15	1300	7,0-7,5	187

Nota-se o aumento na produtividade de biomassa microalgal nos quatro experimentos adicionais, ou seja, nas maiores concentrações de NAT. As maiores produtividades de biomassa ($187\text{-}198,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) foram alcançadas quando a concentração de NAT foi superior a $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e o pH foi mantido entre 7 e 7,5. Esses resultados são superiores à Ribeiro et al., 2020, que recentemente utilizaram três meios de cultura, BG11, BGU (ureia) e BGNIM (ureia, amônia e nitrato) no cultivo da mesma cepa (*C. sorokiniana* | LBA#39) e obtiveram produtividade de $50,9$, $48,8$ e $47,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectivamente.

Além dos experimentos apresentados nas Tabelas 3 e 4, também foram realizados experimentos preliminares cultivando a cepa *C. sorokiniana* | LBA#39 em diferentes diluições de digestato (25, 35, 45, 55 e 65%) sem o controle de pH. Dessa forma, a Figura 7 mostra o crescimento das microalgas de forma comparativa com e sem ajuste de pH.

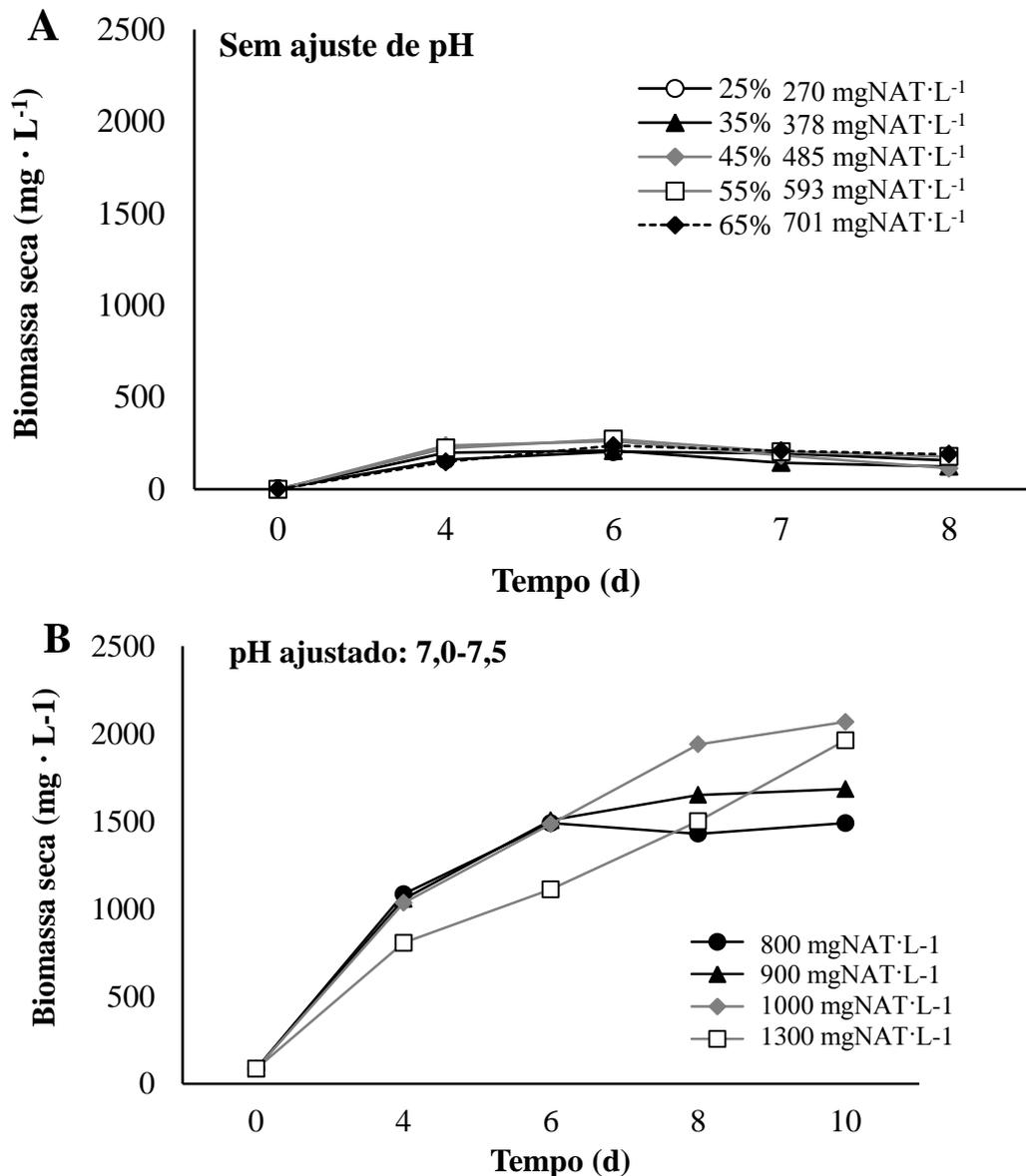


Figura 7 – Crescimento de *C. sorokiniana* | LBA#39 em digestato da suinocultura (A) Sem controle de pH e com diluições do digestato a 25, 35, 45, 55 e 65 (% v·v⁻¹) e (B) Com controle de pH entre 7-7,5 com concentrações de NAT de 800, 900, 1000 e 1300 mg·L⁻¹.

Sem controle de pH, as produtividades máximas foram de 33,0; 34,5; 43,6; 45,4 e 39,4 mg · L⁻¹ · d⁻¹ para as diluições a 25, 35, 45, 55 e 65 (% v·v⁻¹), respectivamente (Figura 7a). Por outro lado, as produtividades com controle de pH (7,0-7,5) foram pelo menos duas vezes maiores, conseguindo 140,2; 159,7; 198,0 e 187,4 mg · L⁻¹ · d⁻¹ para as concentrações de 800, 900, 1000 e 1300 mg_{NAT} · L⁻¹, respectivamente (Figura 7b).

A Tabela 5 resume um comparativo de produtividade e rendimento de biomassa de microalgas com diferentes meios de cultivo.

Tabela 5 – Produtividade e rendimento de biomassa do gênero *Chlorella sp.* sob diferentes meios de cultura.

Espécie	Meio de Cultura	pH	Produtividade de biomassa (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)	Referência
<i>C. minutissima</i>	Sintético	7,2	119	ARORA et al., 2016
<i>C. minutissima</i>	Sintético	6,5	60	KEIL et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> DOE1412	Sintético otimizado PE-001A	7,0	119	QIU et al., 2017
<i>C. sorokiniana</i> 211-8k	Águas residuárias municipais e da suinocultura	-	130	LEITE; HOFFMANN; DANIEL, 2019
<i>C. sorokiniana</i> MB-1-M12	Águas residuárias da cultura de camarão com adição de nutrientes BG11	-	190	CHENG et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> AK-1	Dejeto suíno peneirado com adição de nutrientes BG11	-	290	CHEN et al., 2020
<i>C. sorokiniana</i> LBA#39	BGNIM	-	47	RIBEIRO et al., 2020
<i>C. sorokiniana</i> LBA#39	Digestato suíno não esterilizado	7,0-7,5	198	Este trabalho

Importante ressaltar que a ausência de injeção de CO₂ não foi um fator limitante no crescimento de *C. sorokiniana*, corroborando com (LEITE; HOFFMANN; DANIEL, 2019) que também cresceram *C. sorokiniana* em digestato da suinocultura combinado com efluentes domésticos, atingindo produtividade média de até 130 mg · L⁻¹ · d⁻¹. Da mesma forma, não foram adicionados nutrientes sintéticos para complementar o digestato como meio de cultura. Considerando os resultados de produtividade obtidos com altas concentrações de NAT e pH ajustado, o digestato apresenta potencial e tem como principal vantagem a revalorização dos nutrientes e a redução de custos.

2.3.2.2 Remoção de nutrientes

A fitorremediação do digestato foi avaliada pela remoção de NAT, N e fosfatos (%) (Tabela 6). Os resultados mostram que NAT foi removido entre 9 e 81% e fosfatos entre 15 e 98% após 10 dias de cultivo em todas as condições experimentais testadas.

Tabela 6 – Resultados de remoção de NAT, N e P solúvel.

Experimento	NAT (mg/L)		Remoção de NAT (%)	NO ₂ ⁻		Remoção de N (%)	P solúvel (mg/L)		Remoção de P solúvel (%)
	Inicial	Final		Inicial	Final		Inicial	Final	
M1	211	156	26	38	29	26	6	0,3	94
M2	598	460	23	36	36	22	10	1,1	89
M3	214	170	21	39	32	20	6	5,0	15
M4	599	444	26	44	104	15	13	3,8	71
M5	409	319	22	44	41	21	10	0,9	91
M6	417	315	25	42	39	23	11	0,9	92
M7	517	317	39	41	42	36	11	0,9	92
M8	153	124	19	4	3	19	4	0,1	96
M9	679	425	37	4	23	35	15	2,3	85
M10	437	331	24	4	4	24	9	0,4	96
M11	417	348	16	4	4	16	9	4,5	51
M12	861	234	73	2	19	71	12	0,2	98
M13	988	187	81	2	23	79	25	2,1	91
M14	997	201	80	2	72	73	25	0,9	96
M15	1290	349	73	2	31	70	32	3,8	88

No processo de ficorremediação é possível observar três principais mecanismos de remoção de NAT da fração líquida do digestato: assimilação pela célula na síntese metabólica das microalgas, volatilização de amônia livre e nitrificação, conforme apresenta a Figura 8.

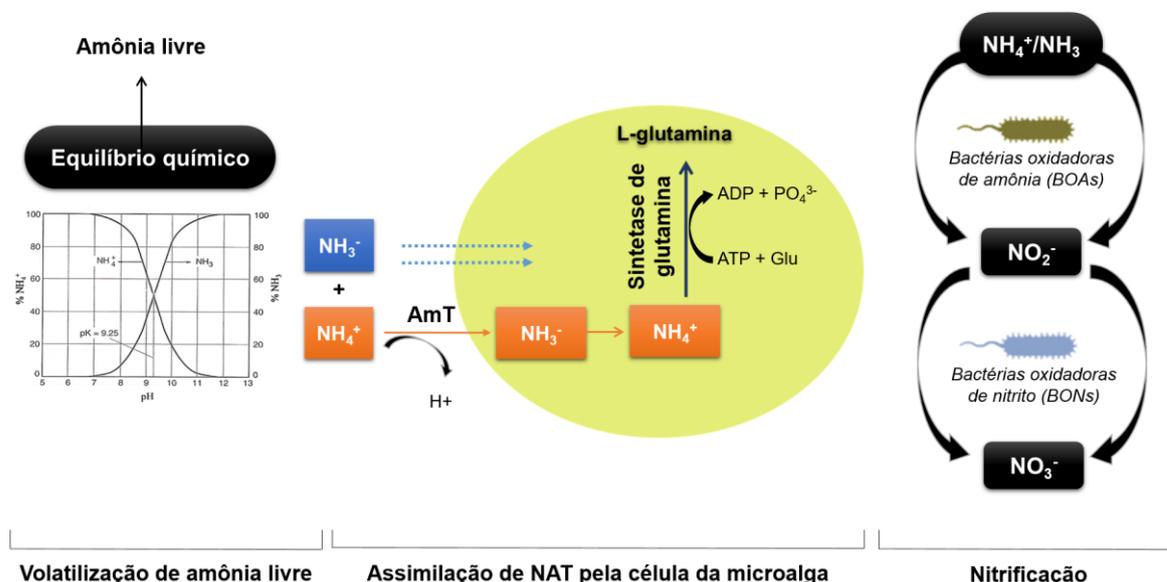


Figura 8 – Mecanismos de remoção de NAT da fração líquida do digestato possíveis de serem observados durante o crescimento das microalgas.

A remoção de N foi calculada considerando a remoção de NAT e NO_2^- e NO_3^- e atingiu 70-78% nas condições em que o pH foi ajustado para 7,0-7,5 com as altas concentrações iniciais de NAT ($\geq 800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). No processo de ficorremediação de águas residuárias utilizando microalgas, NAT é a espécie preferida para ser incorporada, uma vez

que a assimilação não requer a reação redox e a célula consome menos energia (CAI; PARK; LI, 2013; JIA; YUAN, 2016; LUO et al., 2016). Microalgas do gênero *Chlorella* sp. absorvem NH_4^+ por vários transportadores de alta ou baixa afinidade, como Amt (transportador de amônia), enquanto NH_3 pode se difundir livremente através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, o amônio pode ser assimilado pelas vias GS/GOGAT (Glutamina sintetase/glutamato sintase) ou GDH (desidrogenase glutâmica). A principal via de assimilação de nitrogênio é o GS-GOGAT e seu principal produto é a glutamina, componente básico para a síntese de aminoácidos e proteínas (NAGARAJAN et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020).

Além da produtividade de biomassa seca de microalgas ser consideravelmente superior com ajuste de pH entre 7,0-7,5, também foi possível aumentar consideravelmente a concentração de NAT ($1300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Como consequência, maior concentração de NAT em determinadas condições de pH e temperatura pode aumentar a concentração de amônia livre no meio, interferindo na produção de biomassa. A Tabela 7 apresenta os resultados de amônia livre calculados para os experimentos.

Tabela 7 – Resultados de amônia livre (AL) e produtividade média calculada para diferentes concentrações de NAT sob diferentes pH.

Experimento	NAT Inicial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	AL inicial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	AL máx. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	AL máx. (%)	Produtividade média ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)
M1	200	7,0	31	83	47	63
M2	600	7,0	91	99	15	103
M3	200	9,0	31	127	65	20
M4	600	9,0	95	233	34	33
M5	400	8,0	62	146	33	84
M6	400	8,0	65	118	31	89
M7	400	8,0	63	129	29	87
M8	118	8,0	7	42	32	40
M9	682	8,0	39	193	32	136
M10	400	6,6	24	24	5	81
M11	400	9,4	22	286	80	15
M12	800	7,5	32	126	19	140
M13	900	7,5	42	153	21	160
M14	1000	7,5	43	176	18	198
M15	1300	7,5	54	216	18	187

O pH tem grande importância na remoção de NAT e consequente produção de amônia livre por reger o equilíbrio das formas de amônio/amônia ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$). Com pH acima de 9,15 (ponto de equilíbrio), o balanço químico é deslocado para NH_3 , portanto, há uma maior formação de amônia livre. Observa-se na Tabela 7 que à medida que o pH diminui, também diminui a formação de amônia livre, bem como aumenta a produtividade de biomassa.

Portanto, o controle do pH é uma variável importante e deve ser considerada para controlar o efeito tóxico de amônia nas células das microalgas e aumentar a produtividade de biomassa.

Em pH 9,0, o crescimento das microalgas foi inibido com concentrações iniciais de $200 \text{ mgNAT} \cdot \text{L}^{-1}$, resultado que corrobora com a baixa produtividade de biomassa ($M3 = 19,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Também foi observada uma possível inibição com concentração inicial de $400 \text{ mgNAT} \cdot \text{L}^{-1}$ em pH 9,4 (M11), quando a biomassa não cresceu de forma constante após o quarto dia e teve o menor resultado de produtividade ($14,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Outras pesquisas observaram inibição no crescimento de diferentes espécies de microalgas e condições de cultivo. Níveis entre 2 e $34 \text{ mg}_{\text{NH}_3} \cdot \text{L}^{-1}$ reduziram em 77% a velocidade de crescimento de *Scenedesmus* sp. (UGGETTI et al., 2014) e em culturas de *Chlorella vulgaris* houve efeito inibitório com concentração entre 20 e $250 \text{ mg NH}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (TAM; WONG, 1996). Também foi relatada inibição na fotossíntese e no crescimento de *Scenedesmus obliquus* com concentração inicial de amônia de $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em $\text{pH} \geq 8,0$ (ABELIOVICH; AZOV, 1976). Além disso, pesquisas mostram que o aumento do pH também tem impacto na absorção de metais pesados por microalgas em águas residuárias, levando a precipitação de íons metálicos e outros compostos coexistentes, diminuindo a disponibilidade de metais pesados para absorção pela célula (CHENG et al., 2019).

Em resumo, pH neutro entre 7,0 e 8,0 demonstrou menor produção de amônia livre e consequente toxicidade na célula das microalgas, propiciando maior produtividade de biomassa.

Outro processo que pode ocorrer durante o cultivo de microalgas é a nitrificação, caracterizada como um processo biológico que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa bactérias oxidadoras de amônia (BOAs) oxidam NAT a nitrito, enquanto na segunda, outro grupo de bactérias oxidadoras de nitrito (BONs) oxidam nitrito a nitrato. Em todos os experimentos apresentados na Tabela 6 foi verificada uma porcentagem de 0,8 a 17,4% de oxidação de NAT a nitrito (primeira etapa), porém não houve formação de nitrato. O processo de nitrificação já foi observado em cultivos de microalgas e está relacionado à presença de bactérias endógenas no digestato não esterilizado (MOLINUEVO-SALCES et al., 2016). Inclusive, investigações estão avançando sobre a possibilidade de integrar o cultivo de microalgas para o suprimento de oxigênio necessário à nitrificação e melhoramento na remoção de nitrogênio no processo (AKIZUKI; CUEVAS-RODRÍGUEZ; TODA, 2019; KWON et al., 2019).

Com relação à remoção de fosfato, os resultados são expressivos e a remoção foi superior a 90% na maior parte todos os experimentos, com exceção das condições de pH

alcalino (M3, M4, M11) que atingiram remoção inferior a 80% (Tabela 6). A remoção ou recuperação de fósforo torna-se fundamental no contexto ambiental, uma vez que os casos de eutrofização são frequentemente associados à presença de fósforo em regiões de agricultura intensiva (WITHERS et al., 2019), nutriente indisponível para o crescimento e metabolismo das microalgas.

Sugere-se aumentar o tempo de retenção hidráulica no cultivo de microalgas, a fim de melhorar a remoção de nutrientes, principalmente de nitrogênio amoniacal.

2.3.3 POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE BIOGÁS

Aproximadamente $3,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa fresca de microalgas foram colhidas no décimo dia, com teor de sólido volátil (SV) da biomassa de 95,4%, semelhante à Ayala-Parra et al. (2017) com 95% para *C. sorokiniana*. Apesar disso, a umidade da biomassa colhida após centrifugação foi de aproximadamente 94%. Embora a digestão anaeróbia seja uma aplicação viável para biomassa com alto teor de água, como é o caso das microalgas, ainda é um desafio pensar em novas estratégias de concentração de biomassa para melhor aproveitamento energético.

A caracterização da biomassa de *C. sorokiniana* LBA#39 cultivada em digestato resultou em um conteúdo de carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas de 23,4%, 59,5%, 3,1% e 13,96%, respectivamente, com base no peso seco. Este resultado está de acordo com RIBEIRO et al. (2020), que cultivou a mesma cepa de *C. sorokiniana* LBA#39 em três diferentes meios de cultivo e a biomassa apresentou teor de lipídios entre 6,2 e 6,5%, teor de proteínas entre 41,7 e 44,6% e teor de carboidrato de 22,4 e 24,5%. MICHELON et al. (2016) cultivou *Chlorella* sp. em digestato da suinocultura e a composição da biomassa de microalgas colhida foi de 58,9%, 25,2% e 3% de proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente.

O baixo teor lipídico pode estar relacionado às características do digestato da suinocultura, ricos em nitrogênio (PERAZZOLI et al., 2016), uma vez que as proteínas são os principais compostos na biossíntese metabólica de nitrogênio (MICHELON et al., 2016). Molinuevo-Salces et al. (2016) comparou o cultivo de um consórcio de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlamydomonas reinhardtii*) em efluente suíno com baixa concentração de amônio e diferentes condições e o resultado foi uma biomassa com teor de lipídios entre 35-40% no cultivo com baixa concentração de amônio.

A produção cumulativa de biogás da biomassa foi acompanhada até sua estabilização, que durou 36 dias, quando a produção diária de biogás foi igual ou inferior a 1% do total produzido. A digestão anaeróbica da biomassa de *C. sorokiniana* LBA#39 resultou em um potencial bioquímico de biogás (PBB) de $392 \pm 14 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$, com 65% de metano, ou seja, cada kg de biomassa fresca produziu 52 L de biogás e 35 L de CH_4 (Figura 9).

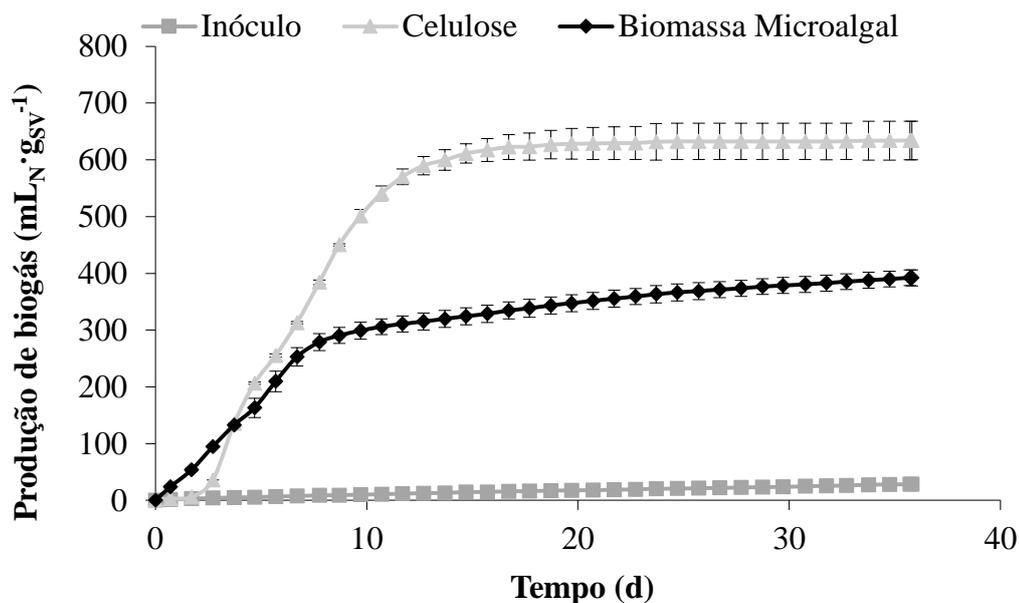


Figura 9 – Produção cumulativa de biogás por conteúdo volátil de sólidos usando biomassa de *C. sorokiniana* LBA#39 cultivada em digestato da suinocultura em comparação aos controles (inóculo e celulose).

A Tabela 8 mostra a produção de biogás de outras cepas de microalgas e condições de cultura.

Tabela 8 – Produção de biogás de outras espécies de microalgas crescidas em diferentes meios de cultura.

Microalga	Meio de cultura	Composição da biomassa microalgal			PBM (mL _N · g _{SVad} ⁻¹)	Referência
		Proteína (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)		
<i>C. sorokiniana</i>	-	-	-	-	318	BELTRÁN et al., 2016
<i>C. sorokiniana</i> 1412	Sintético	-	9	-	260-360	AYALA-PARRA et al., 2017
<i>Spirulina platensis</i>	Sintético	40	3	46	326 ± 2	REMPEL et al., 2019
<i>Scenedesmus</i> sp.	Digestato suíno	58	4	28	389 ± 27	PERAZZOLI et al., 2016
<i>C. sorokiniana</i> LBA#39	Digestato suíno	59	3	23	262 ± 9	Esse estudo

Um dos principais elementos para alcançar um balanço energético positivo na biodigestão de biomassa microalgal é uma alta conversão de material orgânico em metano (MILLEDGE et al., 2019). A concentração de CH₄ foi de 65%, representando um PBM de $262 \pm 9 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$. O controle experimental positivo usando substrato de celulose microcristalina produziu um valor cumulativo de metano de $358 \pm 18 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$, de acordo com o esperado (HOLLIGER et al., 2016).

Um maior teor de proteínas pode ser observado na biomassa de microalgas e produzir biogás com alto teor de CH₄, já que as proteínas apresentam taxas de conversão mais rápidas do que os lipídios complexos durante o processo de biodigestão (PERAZZOLI et al., 2016; REMPEL et al., 2019). A digestão anaeróbica da biomassa de algas tem como principal vantagem reduzir os custos de secagem e extração da biomassa antes do processamento, no entanto, os rendimentos de biogás ainda merecem novas estratégias para aumentar o balanço energético e superar desafios como a umidade, baixa biodegradabilidade e o risco de inibição da amônia associada à monodigestão de microalgas (MILLEDGE et al., 2019; MONTINGELLI; TEDESCO; OLABI, 2015).

Estudos relataram que a codigestão anaeróbia de biomassa de *C. sorokiniana* com dejetos suíno em uma proporção 25:75 (microalgas : dejetos), aumentou o rendimento de CH₄ em 39% em comparação à monodigestão de microalgas e em 22% em comparação à monodigestão de dejetos suíno (BELTRÁN et al., 2016). Outros autores também sugerem a codigestão utilizando dejetos suíno e biomassa de microalgas colhidas após o processo de fitorremediação de digestato, visando aumentar a taxa de carga orgânica, fornecer alcalinidade, macro e micronutrientes ao processo (SOLÉ-BUNDÓ et al., 2019) e integrar o cultivo de microalgas ao processo de biodigestão anaeróbia aplicado à suinocultura (MOLINUEVO-SALCES et al., 2016; NAGARAJAN et al., 2019; PERAZZOLI et al., 2016).

2.3.3.1 Cenários de produção energética no contexto da economia circular

Foram criados três cenários com rotas hipotéticas para avaliar o potencial de produção de biogás da suinocultura integrando o cultivo de microalgas ao processo (Figura 10).

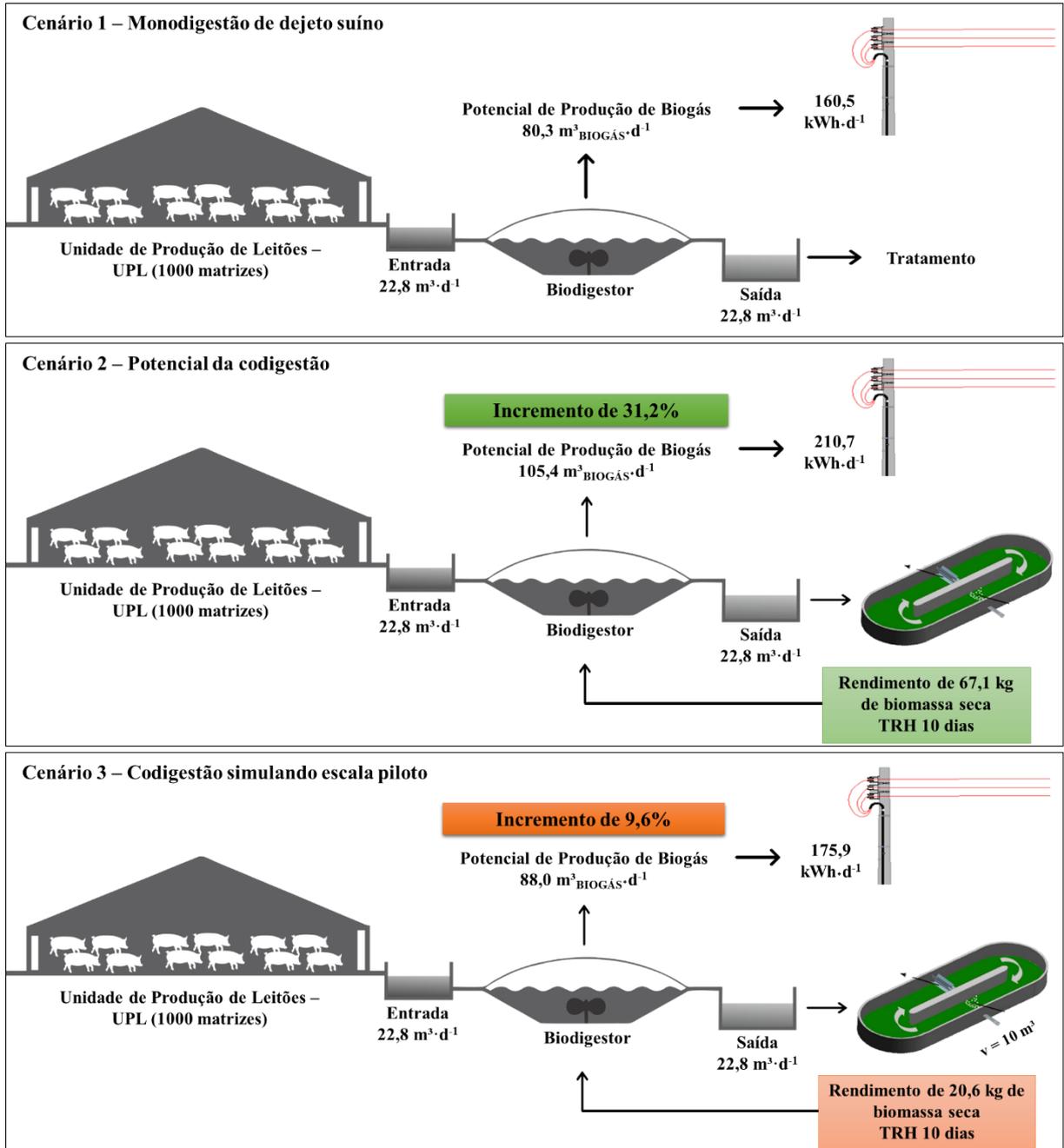


Figura 10 – Simulação de cenários em que o cenário 1 compreende a monodigestão de dejetos suínos de uma unidade de produção hipotética; o Cenário 2 mostra o potencial da codigestão de dejetos suínos com biomassa de *C. sorokiniana* LBA#39 e o Cenário 3 considera um cenário de codigestão simulando uma escala piloto.

O cenário 1 compreende a monodigestão de dejetos suínos em uma UPL. O potencial de produção de biogás calculado foi de aproximadamente $80,3 \text{ m}^3_{\text{BIOGÁS}} \cdot \text{d}^{-1}$, considerando um biodigestor de aproximadamente 1000 m^3 . Essa produção resultaria em $160,5 \text{ kWh} \cdot \text{d}^{-1}$ de energia elétrica.

No Cenário 2, considerou-se o maior rendimento de biomassa ($2067,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), sendo utilizados aproximadamente $0,7 \text{ L}$ de digestato com TRH de 10 dias. Dessa forma, para produzir 1 kg de biomassa seriam tratados aproximadamente 340 L de digestato com

concentração de $1400 \text{ mgNAT} \cdot \text{L}^{-1}$. Neste caso, o digestato representa aproximadamente 70% do volume total do cultivo de microalgas. Considerando o digestato do Cenário 1 como meio de cultivo, seriam produzidos 67,1 kg de biomassa seca de microalgas, estimando um incremento de 31,2% da produção de biogás em relação ao cenário 1.

No contexto do cenário 3, em uma escala piloto o incremento seria de 9,6% na produção de biogás. Em um ano, foram estimados $2555,0 \text{ m}^3$ de digestato reciclados em biomassa para conversão de energia. Ressalta-se que todas as estimativas foram realizadas com base em ensaios laboratoriais e na prática, podem haver perdas ou variações na produção de biomassa de microalgas e de biogás.

Nessa perspectiva, enquanto a biomassa colhida pode ser adicionada aos biodigestores para aumentar a produção de biogás, a água de reuso obtida no processo de fitorremediação pode ser reciclada no sistemas de cultivo de microalgas (MICHELON et al., 2019), contribuindo para minimizar o uso de água na produção de biocombustíveis. Concomitantemente, as limitações incluem os custos operacionais da colheita de biomassa em maior escala, com o objetivo de melhorar a conversão do biometano.

2.4 CONCLUSÕES

O uso de digestato suíno para produção de biomassa de microalgas e simultâneo polimento torna-se uma alternativa promissora, pois a cepa *C. sorokiniana* | LBA#39 conseguiu tolerar altas concentrações de NAT ($\geq 1300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em pH neutro (pH 7,0-7,5), obtendo alta produtividade de biomassa ($198,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), remoção de fosfatos superior à 90% e remoção de NAT e N total superior à 70%.

A biomassa colhida após fitorremediação do digestato apresentou alto teor de sólidos voláteis (95,4%) e proteínas (59,5%). O potencial bioquímico de biogás da monodigestão de microalgas foi de $392 \pm 14 \text{ mL}_N \cdot \text{g}_{\text{SVad}}^{-1}$ ($\text{CH}_4 = 65\%$) e a integração do cultivo de microalgas com a digestão anaeróbia resultou em um incremento de até 31,2% na produção de biogás em uma granja de suínos. Essa é uma abordagem atraente para integração de matéria-prima à instalações agroindustriais existentes, mitigar as emissão de GEE, melhorar a produção de biogás no atual cenário do agronegócio bem como melhorar a viabilidade econômica do sistema de geração de energia, inserindo o conceito de economia circular ao processo.

2.5 AGRADECIMENTOS

Agradecimento pelo aporte técnico e financeiro da CAPES, CNPq, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves e Projeto SISTRATES/BNDES.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801–806, 1 jun. 1976.

ABPA. Relatório Anual. **Associação Brasileira Proteína Animal**, 2019.

AKIZUKI, S.; CUEVAS-RODRÍGUEZ, G.; TODA, T. Microalgal-nitrifying bacterial consortium for energy-saving ammonia removal from anaerobic digestate of slaughterhouse wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, p. 100753, out. 2019.

ALCÁNTARA, C. et al. Microalgae-based Wastewater Treatment. In: **Handbook of Marine Microalgae**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 439–455.

AMARAL, A. C. DO et al. Swine effluent treatment using anaerobic digestion at different loading rates. **Engenharia Agrícola**, v. 34, n. 3, p. 567–576, jun. 2014.

ANTHONISEN, A. C. et al. Inhibition of nitrification and nitrous acid compounds. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 48, n. 5, p. 835–852, 1976.

AOCS. **Crude Protein in Cereal Grains and Oilseeds**. Method 992.23.

Anais...1995Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UACHBC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000988>>. Acesso em: 20 fev. 2020

AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. Champaign, IL: 2013

APHA. **Standard Methods for the Examination for Water and Wastewater**. twenty-second ed. Washington, DC: [s.n.].

ARORA, N. et al. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, ago. 2016.

AYALA-PARRA, P. et al. Nutrient recovery and biogas generation from the anaerobic digestion of waste biomass from algal biofuel production. **Renewable Energy**, v. 108, p. 410–416, ago. 2017.

AYRE, J. M.; MOHEIMANI, N. R.; BOROWITZKA, M. A. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. **Algal Research**, v. 24, p. 218–226, jun. 2017.

BABU, A. G. et al. Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation. **Algal Research**, v. 23, p. 178–185, abr. 2017.

BELTRÁN, C. et al. Batch anaerobic co-digestion of waste activated sludge and microalgae (*Chlorella sorokiniana*) at mesophilic temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 51, n. 10, p. 847–850, 23 ago. 2016.

BI, Z.; HE, B. B. Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. **Transactions of the ASABE**, v. 56, n. 4, p. 1529–1539, 4 set. 2013.

BRASIL, B. S. A. .; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, v. 39, p. 90–98, out. 2017.

CAI, T.; PARK, S. Y.; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, mar. 2013.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122814, abr. 2020.

CHEN, G.; ZHAO, L.; QI, Y. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. **Applied Energy**, v. 137, p. 282–291, jan. 2015.

CHENG, D. L. et al. Microalgae biomass from swine wastewater and its conversion to bioenergy. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 109–122, 1 mar. 2019.

CUARESMA FRANCO, M. et al. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 693–699, 7 ago. 2012.

DE-BASHAN, L. E. et al. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4980–4989, jul. 2008.

DE PRÁ, M. C. et al. Simultaneous removal of TOC and TSS in swine wastewater using the partial nitrification process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 87, n. 12, p. 1641–1647, dez. 2012.

HADI, S. I. I. A. et al. DNA Barcoding Green Microalgae Isolated from Neotropical Inland Waters. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149284, 22 fev. 2016.

HASAN, A.; BAHAUDDIN, K. M. Prospect and potential of biogas energy and its technology: a sustainable clean energy future of Bangladesh. **International journal of advanced renewable energy research**, v. 1, n. 6, p. 313–322, 2012.

HOLDMANN, C. et al. Keeping the light energy constant — Cultivation of *Chlorella sorokiniana* at different specific light availabilities and different photoperiods. **Algal Research**, v. 29, p. 61–70, 1 jan. 2018.

HOLLIGER, C. et al. Towards a standardization of biomethane potential tests. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 11, p. 2515–2522, 14 dez. 2016.

JIA, H.; YUAN, Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environmental Science**, v. 2, n. 1, 29 dez. 2016.

KEIL, T. et al. Polymer-based ammonium-limited fed-batch cultivation in shake flasks improves lipid productivity of the microalga *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121821, nov. 2019.

KIMURA, S. et al. Nutrient removal from anaerobic digestion effluents of aquatic macrophytes with the green alga, *Chlorella sorokiniana*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, p. 170–177, fev. 2019.

KOUTRA, E. et al. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 819–833, ago. 2018.

KUNZ, A.; MIELE, M.; STEINMETZ, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 22, p. 5485–5489, nov. 2009.

KUNZ, A.; MUKHTAR, S. HYDROPHOBIC MEMBRANE TECHNOLOGY FOR AMMONIA EXTRACTION FROM WASTEWATERS. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 2, p. 377–386, abr. 2016.

KWON, G. et al. Co-culture of microalgae and enriched nitrifying bacteria for energy-efficient nitrification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 152, p. 107385, dez. 2019.

LEITE, L. DE S.; HOFFMANN, M. T.; DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. **Journal of Water Process Engineering**, v. 31, p. 100821, out. 2019.

LI, T. et al. High productivity cultivation of a heat-resistant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 60–67, mar. 2013.

LUO, L. et al. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 135–141, set. 2016.

MARQUES, S. S. I. et al. Growth of *Chlorella vulgaris* on Sugarcane Vinasse: The Effect of Anaerobic Digestion Pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 8, p. 1933–1943, 7 dez. 2013.

MEDIPALLY, S. R. et al. Microalgae as Sustainable Renewable Energy Feedstock for Biofuel Production. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

MICHELON, W. et al. Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 7, p. 1407–1419, 22 abr. 2016.

MICHELON, W. et al. Residual sugar from microalgae biomass harvested from phycoremediation of swine wastewater digestate. **Water Science and Technology**, v. 79, n. 11, p. 2203–2210, 1 jun. 2019.

MILLEDGE, J. et al. A Brief Review of Anaerobic Digestion of Algae for Bioenergy. **Energies**, v. 12, n. 6, p. 1166, 26 mar. 2019.

MILLEDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 10, n. 1, p. 31–41, 19 mar. 2011.

MOLINUEVO-SALCES, B. et al. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1103–1110, out. 2016.

MONTINGELLI, M. E.; TEDESCO, S.; OLABI, A. G. Biogas production from algal biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 961–972, mar. 2015.

NAGARAJAN, D. et al. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121718, out. 2019.

NOKKAEW, A. et al. AMMONIA UPTAKE BY UNICELLULAR GREEN MICROALGAE: MATHEMATICAL MODELING AND PARAMETER OPTIMIZATION. **Southeast Asian Journal of Sciences**, v. 2, n. 1, p. 41–51, 2013.

OSUNDEKO, O. et al. Promises and Challenges of Growing Microalgae in Wastewater. In: **Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 29–53.

PERAZZOLI, S. et al. Optimizing biomethane production from anaerobic degradation of *Scenedesmus* spp. biomass harvested from algae-based swine digestate treatment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 109, p. 23–28, abr. 2016.

PRANDINI, J. M. et al. Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 67–75, fev. 2016.

QIU, R. et al. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, p. 192–199, dez. 2017.

REDFIELD, A. C. **THE BIOLOGICAL CONTROL OF CHEMICAL FACTORS IN THE ENVIRONMENT** American Scientist Sigma Xi, The Scientific Research Honor Society, , 1958. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/27827150>>. Acesso em: 22 fev. 2020

REMPEL, A. et al. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121588, set. 2019.

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**, v. 9, p. 100354, fev. 2020.

RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, set.

2018.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. [s.l.] CRC Press, 2014.

SOLÉ-BUNDÓ, M. et al. Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, p. 471–482, set. 2019.

STANIER, R. Y. et al. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). **Bacteriological reviews**, v. 35, n. 2, p. 171–205, jun. 1971.

STEINMETZ, R. L. R. et al. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 21–28, nov. 2016.

STILES, W. A. V. et al. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 732–742, nov. 2018.

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, jul. 1996.

TÁPPARO, D. C. et al. Sanitary effectiveness and biogas yield by anaerobic co-digestion of swine carcasses and manure. **Environmental Technology**, v. 41, n. 6, p. 682–690, 7 mar. 2019.

UGGETTI, E. et al. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 437–443, 1 jan. 2014.

VDI. **VDI 4630 fermentation of organic materials – characterization of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests**. Düsseldorf: [s.n.].

WANG, J.; CURTIS, W. R. Proton stoichiometric imbalance during algae photosynthetic growth on various nitrogen sources: toward metabolic pH control. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 43–52, 7 fev. 2016.

WITHERS, P. J. A. et al. A Global Perspective on Integrated Strategies to Manage Soil Phosphorus Status for Eutrophication Control without Limiting Land Productivity. **Journal of Environmental Quality**, v. 48, n. 5, p. 1234–1246, 25 set. 2019.

XIA, A.; MURPHY, J. D. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 264–275, abr. 2016.

ZHENG, Y. et al. High-density fed-batch culture of a thermotolerant microalga *Chlorella sorokiniana* for biofuel production. **Applied Energy**, v. 108, p. 281–287, ago. 2013.

3. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Definir estratégias de controle de pH em escala ampliada para evitar toxicidade por amônia livre nas células das microalgas utilizando digestato suíno como meio de cultura.
- Investigar protocolos de ação corretiva de curto prazo, ou seja, metodologias baratas, fáceis e rápidas, para evitar a perda de produção ou decaimento dos índices técnicos.
- Aprofundar protocolos de colheita, processamento e armazenamento da biomassa até seu uso.
- Caracterizar a biomassa de microalgas produzida quanto à possíveis contaminantes (elementos traços, patógenos), bem como o desenvolvimento de testes que garantam a biossegurança sanitária do uso da biomassa para fins de nutrição humana e animal.
- Realizar um estudo considerando todas as variáveis do cultivo de microalgas integrado à digestão anaeróbia na suinocultura em escala ampliada (mercado, planos de negócios, associações de produtores, prospecções de potenciais da biomassa, planos de biorrefinaria, etc).