



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Camylle Guimarães Scheliga

**Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio  
amoniaco de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e  
bactérias heterotróficas**

Rio de Janeiro

2022

Camylle Guimarães Scheliga

**Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química ambiental

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

S322 Scheliga, Camylle Guimarães.

Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas. – 2022.

134 f.

Orientador(a): Mônica Regina da Costa Marques Calderari

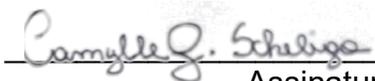
Coorientador(a): Claudia Maria Luz Lapa Teixeira

Dissertação (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de Química.

1. Biopolímeros – Teses. 2. Nitrogênio amoniacal – Teses. 3. Cianobactéria – Teses. I. Calderari, Mônica Regina da Costa Marques. II. Teixeira, Claudia Maria Luz Lapa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 577.11

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

05/07/2022

Data

Camylle Guimarães Scheliga

**Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química ambiental.

Aprovada em 23 de maio de 2022.



Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari (IQ/UERJ) Orientadora

MEMBROS DA BANCA:



Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira (INT)

Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso (EMBRAPA)

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (IQ/UERJ)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Maria Pereira Neto (UFABC)

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marcia Marques Gomes (FEN/UERJ)

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

A minha querida mãe, Maria Lúcia Guimarães Scheliga, e à querida Kamilla Charla Gusmão Caliman, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pai de todas as leis da natureza, por cada inspiração que direcionou o presente estudo e proporcionou os resultados alcançados.

Aos meus pais, Maria Lúcia Guimarães Scheliga e Ernesto Augusto Scheliga, pelos valores morais de minha criação e por sempre mencionarem que a sabedoria sempre será minha herança mais importante.

A minha querida mãe por seu amor, por ter acreditado fielmente no meu trabalho e ter sido uma agência de fomento da minha bolsa de doutoramento no período pandêmico. Sem a qual o presente estudo não poderia ser concluído.

Ao Burt, meu irmão, e Bruna, cunhada, por cada apoio, palavra amiga e por terem me presenteado com o meu afilhado e pequeno sol, Pedro de Oliveira Scheliga, responsável por cada sorriso nos períodos mais difíceis do doutoramento.

A minha querida Kamilla Charla Gusmão Caliman, a quem todas as palavras não seriam suficientes para expressar minha gratidão por cada ombro e por ser incansável em transformar com amorosidade minha ansiedade em felicidade nos momentos decisivos do doutoramento. Equilibrou, assim, meu foco entre o estudo da vida enquanto ciência e enquanto modo de viver.

Aos meus queridos, eternos amigos e anjos Ana Carolina, Nathalia, Nádia, Raquel, Aline, Bruna, Júlia, Jhenyfer e Gabriel por serem meus alicerces e por cada momento inesquecível que me manteve firme para atravessar essa jornada.

Aos meus queridos tios Helena, Antônio e Orlando e primos Vinícius e Fernanda por me incentivarem à avidez por conhecimento desde a infância. Pela ajuda desde os primeiros livros, cadernos, posteriormente, no vestibular, e, por fim, no doutoramento.

Aos meus queridos sogros Cátia e Charles e minha cunhada Katiely por cada oração pelo meu doutoramento e por sempre me apoiarem, acreditando fielmente em mim enquanto cientista.

A minha psicóloga Aline Alves e à Dra. Simone pela amizade, autoconhecimento e por enaltecer minha fé em mim e nos meus sonhos profissionais.

As minhas queridas orientadoras Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari e Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira. Aprendi que conheci verdadeiras líderes quando lideraram, não de forma plenamente autocrática, mas, sim, sendo luz pacífica nos momentos mais decisivos. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pela competência, amizade, confiança e apoio nos momentos em que mais precisei para concluir esse estudo.

A todos os amigos que passaram pelo LABIM (INT) e LABTAM (UERJ) pelo ombro, risadas, amizade, parceria, suavizando essa jornada através de momentos incríveis: Alenne, Letícia, Laura, Priscila, Gustavo, Aline, Pedro, Jeferson, Isabela, Ana Clara, Lucas, Keysson, Maria, Jonatas, Andréa e Nathália.

Aos colaboradores do Instituto Nacional de Tecnologia e da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, em especial ao Luiz Oliveira e à Viviane Galvão, pelas orientações pacientes e ajuda em cada etapa do presente estudo.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro pela contribuição em minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos.

Devemos nos voltar à natureza. Pois a natureza é boa, assim como as pessoas são, de natureza, boas.

*Jean-Jacques Rousseau*

## RESUMO

SCHELIGA, C. G. *Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas*. 217 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2022.

Mesmo após a digestão anaeróbica do lixiviado de aterro sanitário, de efluentes municipais e de diversos efluentes agroindustriais (destilarias, criação de bovinos, suínos, aves, e búfalos) é relatado que concentrações de nitrogênio amoniacal acima de  $800 \text{ mg.L}^{-1}$  podem estar presentes nesses efluentes. A elevada concentração de nitrogênio amoniacal nesses efluentes leva à eutrofização dos corpos hídricos caso não haja um processo eficiente e viável de tratamento. Até então, há uma busca por um processo eficiente e economicamente viável para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes. Através da versatilidade metabólica das cianobactérias, esta fonte de nitrogênio pode ser utilizada e removida, produzindo carotenóides, ficobiliproteínas e biopolímeros (polihidroxialcanoatos) de interesse industrial. O desafio para torná-lo viável é a toxicidade do nitrogênio amoniacal para as cianobactérias. Estudos recentes têm demonstrado que a inserção de uma fonte orgânica no meio amoniacal reduz a toxicidade do nitrogênio amoniacal para as cianobactérias pela maior independência de seu aparato fotossintetizante afetado pela toxicidade do nitrogênio amoniacal. Dessa forma, o presente estudo foi inovador ao propor a valorização do glicerol bruto residual da produção de biodiesel e sua utilização como fonte orgânica para biorremediação de efluentes industriais por cianobactérias. Além disso, o uso de efluentes industriais como fonte de nitrogênio para seu crescimento tem o potencial de reduzir os custos com o meio de produção das cianobactérias já que as fontes nitrogenadas possuem alto impacto em seu custo. Desenvolveu-se um bioprocesso utilizando as melhores estratégias (aumento da concentração inicial de biomassa, condução do bioprocessos por batelada alimentada, controle do pH do bioprocessos e mixotrofia) de forma sinérgica e inovadora. A inserção do glicerol bruto residual permitiu o estabelecimento de uma cultura mista de *Arthrospira (Spirulina) platensis* e bactérias heterotróficas. As bactérias cresceram em produtividade volumétrica de biomassa de  $0,435 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  e tiveram um acúmulo de biopolímeros máximo e teórico de  $49 \pm 7\%$  da biomassa. Já a *A. platensis* foi produzida em produtividade de  $0,226 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , e teve alta importância na produção de pigmentos de alto valor agregado (ficocianina,  $84,2 \pm 2,8 \text{ mg.g}^{-1}$  e carotenoides totais,  $1,62 \pm 0,18 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Houve a assimilação de nitrogênio amoniacal próxima de  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  em apenas 8 dias

de bioprocesso. No oitavo dia, o bioprocesso encontrava-se estável, com um consumo diário de nitrogênio amoniacal de  $100 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e em eficiência de remoção de 100%. Não houve presença de nitrito e nitrato no meio após o bioprocesso cujas condições são promissoras, em comparação aos resultados recém-publicados na literatura, para serem avaliadas por outras espécies de microalgas com produção de outros compostos de interesse industrial. Sendo assim, o bioprocesso desenvolvido mostrou-se atrativo para biorremediação dos efluentes industriais sob o ponto de vista econômico e ambiental.

Palavras-chave: Nitrogênio amoniacal. Cianobactéria. *A. platensis*. Polihidroxicarbohidratos. Glicerol bruto residual.

## ABSTRACT

SCHELIGA, C. G. *Desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes com produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas*. 217 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2022.

Even after anaerobic digestion of leachate, municipal effluents and various agro-industrial effluents (distilleries, cattle, swine, poultry, and buffalo) it is reported that ammoniacal nitrogen concentrations above  $800 \text{ mg.L}^{-1}$  may be present in these effluents. The high concentration of ammoniacal nitrogen in these effluents leads to eutrophication of water bodies if there is no efficient and viable treatment process. Nowadays, there is a search for an efficient and economically viable process for the bioremediation of ammoniacal nitrogen from effluents. Through the metabolic versatility of cyanobacteria, this nitrogen source can be used and removed, producing carotenoids, phycobiliproteins and biopolymers (polyhydroxyalkanoates) of industrial interest. The challenge to make it viable is the toxicity of ammoniacal nitrogen to cyanobacteria. Recent studies have shown that the insertion of an organic source in the ammoniacal medium reduces the toxicity of ammoniacal nitrogen to cyanobacteria due to the greater independence of their photosynthetic apparatus affected by the toxicity of ammoniacal nitrogen. Thus, the present study was innovative in proposing the application of residual crude glycerol from biodiesel production with its use as an organic source for bioremediation of industrial effluents by cyanobacteria. In addition, the use of industrial effluents as a source of nitrogen for their growth has the potential to reduce the costs of the cyanobacteria production medium, since the nitrogen sources have a high impact on their cost. A bioprocess was developed using the best strategies (high initial biomass concentration, conduction of the bioprocess by fed batch, control of the pH of the bioprocess and mixotrophy) in a synergistic and innovative way. The insertion of residual crude glycerol allowed the establishment of a mixed culture of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and heterotrophic bacteria. The bacteria grew at a volumetric biomass productivity of  $0.435 \pm 0.004 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  and had a maximum and theoretical biopolymer accumulation of  $49 \pm 7\%$  of the biomass. *A. platensis* was produced at a productivity of  $0.226 \pm 0.005 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , producing high value-added pigments (phycocyanin,  $84.2 \pm 2.8 \text{ mg.g}^{-1}$  and total carotenoids,  $1,62 \pm 0.18 \text{ mg.g}^{-1}$ ). The assimilation of ammoniacal nitrogen was close to  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  in just 8 days of bioprocess. On the eighth day,

the bioprocess was stable, with a daily consumption of nitrogen ammoniacal concentration of 100 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> and removal efficiency of 100%. There was no presence of nitrite and nitrate in the medium after the bioprocess whose conditions are promising, compared to the results recently published in the literature, to be evaluated by other species of microalgae with production of other compounds of industrial interest. Therefore, the developed bioprocess showed to be attractive for bioremediation of industrial effluents from an economic and environmental point of view.

Keywords: Ammoniacal nitrogen. Cyanobacteria. *A. platensis*. Polyhydroxyalkanoates. Residual crude glycerol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processos biológicos convencionais utilizados para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes	34
Figura 2 – Nitrificação parcial seguida do processo Anammox	36
Figura 3 – Assimilação de diferentes fontes de nitrogênio por microalgas	39
Figura 4 – Diversidade morfológica de cianobactérias por microscopias de contraste interferencial diferencial (DIC) e ilustração da produção em larga escala de <i>Spirulina platensis</i>	46
Figura 5 – Organização do ficobilissoma em <i>A. platensis</i>	46
Figura 6 – Carotenoides produzidos por <i>Spirulina platensis</i>	47
Figura 7 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos	51
Figura 8 – Esquema de um bioprocessos para produção de polihidroxicanoatos a partir de cianobactérias	56
Figura 9 – Exemplos de vias metabólicas de <i>Synechocystis</i> PCC6803 para produção de PHA	58
Figura 10 – Vias de síntese e degradação do polihidroxiacetato	59
Figura 11 - Esquema das etapas desenvolvidas no presente estudo	66
Figura 12 – Resumo da metodologia utilizada para estimativa da produção de <i>Arthrospira platensis</i> , <i>Synechocystis</i> D202 e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal	74
Figura 13 – Resumo da metodologia de aclimação de <i>Arthrospira platensis</i> em concentrações crescentes de N-amoniacal	77
Figura 14 – Esquema dos experimentos realizados para avaliar a influência da inserção do glicerol bruto residual e da concentração de nutrientes para assimilação do nitrogênio amoniacal por <i>A. platensis</i>	80
Figura 15 – Disposição dos experimentos na mesa agitadora com iluminação e reunião da biomassa utilizada como inóculo	81
Figura 16 – Esquema dos experimentos em garrações com volume útil inicial de 1L	84

Figura 17 – Etapas para extração de polihidroxialcanoatos da biomassa do cultivo misto de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas	97
Figura 18 – Esquema das posições utilizadas para medição da densidade de fluxo fotônico dos ensaios em frascos agitados	98
Figura 19 – Esquema das posições utilizadas para medição da densidade de fluxo fotônico dos ensaios em garrações de 5 L	99
Figura 20– Conjunto de experimentos com elevada concentração inicial de <i>A. platensis</i> (0,5 e 1 g.L-1) e conduzido por batelada alimentada em fonte amoniacal, além de ensaios não inoculados de controle de evaporação da amônia. Foto tirada no início do experimento	113
Figura 21 – Aspecto dos experimentos ao fim do cultivo misto de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas em glicerol bruto residual e fonte amoniacal	126
Figura 22 – Biopolímeros secos e extraídos da biomassa produzida durante o bioprocessamento em glicerol bruto residual e menor suplementação de nutrientes para assimilação de nitrogênio amoniacal	130
Figura 23 – Análise colorimétrica para quantificação de glicerol na cultura de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas em meio amoniacal contendo Glicerol bruto residual por batelada alimentada	136
Figura 24 – Aspecto dos biopolímeros extraídos de <i>A. platensis</i> em cultivos conduzidos por batelada sequencial (SBR) em diferentes composições de luz	169

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Correlação entre os dados obtidos pelas análises por espectrofotometria visível e por massa seca da cianobactéria <i>Synechocystis</i> D202	87
Gráfico 2 – Correlação entre os dados obtidos pelas análises por espectrofotometria visível e por massa seca da cianobactéria <i>A. platensis</i>	88
Gráfico 3 – Correlação entre as absorvâncias, obtidas pelas análises espectrofotométricas a 750 nm, e a concentração de proteínas totais	93
Gráfico 4 – Correlação entre as absorvâncias, obtidas pelas análises espectrofotométricas a 410 nm, e a concentração de glicerol	95
Gráfico 5 – Perfil de crescimento de <i>A. platensis</i> em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal e em culturas controle com nitrato de sódio	102
Gráfico 6 – Perfil de crescimento de <i>Synechocystis</i> D202 em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal e em culturas controle com nitrato de sódio	102
Gráfico 7 – Produção de carotenoides totais por <i>Arthrospira platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em meio de Zarrouk com sulfato de amônio. As barras de erro representam o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os resultados analisados pelo teste de Tukey (alfa de 0,05)	107
Gráfico 8 – Comparação de estratégias para o aumento da produção de <i>A. platensis</i> em meio amoniacal	110
Gráfico 9 – Perfil de crescimento de <i>A. platensis</i> com inóculos de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup> e concentração inicial de NH <sub>3</sub> em torno de 50 mg.L <sup>-1</sup> (0,3 g.L <sup>-1</sup> de sulfato de amônio). Experimentos controle em nitrato de sódio com concentrações equivalentes de nitrogênio também foram realizados	114
Gráfico 10 – Parâmetros dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup> . As barras de erro representam o desvio padrão	117
Gráfico 11 – Perfil de consumo de nitrogênio amoniacal por <i>A. platensis</i> nos experimentos com glicerol bruto residual em batelada alimentada	122
Gráfico 12 – Perfil de consumo de nitrogênio amoniacal por <i>A. platensis</i> nos experimentos sem glicerol bruto residual em batelada alimentada	122
Gráfico 13 – Acompanhamento do pH ao longo do cultivo dos experimentos com <i>A. platensis</i> conduzidos por batelada alimentada com e sem Glicerol bruto residual e em diferentes soluções de alimentação	126
Gráfico 14 – Remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos com <i>A. platensis</i> conduzidos por batelada alimentada com e sem Glicerol bruto residual e em diferentes soluções de alimentação	128

Gráfico 15 – Produtos de interesse industrial produzidos por <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas durante o experimento para remoção de nitrogênio amoniacal, em batelada alimentada, com glicerol bruto residual e solução de alimentação contendo baixas concentrações de nutrientes	129
Gráfico 16 – Perfil de crescimento e consumo de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas em batelada alimentada e com Glicerol bruto residual	132
Gráfico 17 – Assimilação de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas e avaliação da presença de nitrito e nitrato como intermediários no bioprocesso conduzido por batelada alimentada em presença de Glicerol bruto residual	133
Gráfico 18 – Compostos de interesse industrial produzidos por <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas durante o bioprocesso desenvolvido para o aumento da assimilação de nitrogênio amoniacal em presença de Glicerol bruto residual	135
Gráfico 19 – Resultado da análise de DRX do biopolímero extraído e produzido durante o bioprocesso para remoção de nitrogênio amoniacal	137
Gráfico 20 – Espectrograma da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada (FTIR-ATR) dos biopolímeros produzidos durante o bioprocesso	138
Gráfico 21 – Termograma de DSC obtido diante do aquecimento do biopolímero extraído e produzido durante o bioprocesso desenvolvido	140
Gráfico 22 – Termograma da análise de TGA do biopolímero produzido	141
Gráfico 23 – Cultivos de <i>A. platensis</i> conduzidos por batelada sequencial (primeiro estágio) e por batelada simples e em diferentes D.F.F e diferentes qualidades espectrais de luz (LED branco e rosa).	167
Gráfico 24 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa por <i>A. platensis</i>	170
Gráfico 25 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa por <i>A. platensis</i>	171
Gráfico 26 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Arthrospira platensis</i>	172
Gráfico 27 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Arthrospira platensis</i>	173
Gráfico 28 – Teste de Normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) por <i>Synechocystis</i> D202	174

Gráfico 29 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) por <i>Synechocystis</i> D202	174
Gráfico 30 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) por <i>Synechocystis</i> D202	175
Gráfico 31 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Synechocystis</i> D202	176
Gráfico 32 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Synechocystis</i> D202	176
Gráfico 33 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) por <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	177
Gráfico 34 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) por <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	178
Gráfico 35 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	178
Gráfico 36 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	179
Gráfico 37 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro produção de carotenoides totais por <i>A. platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em fontes amoniacais	180
Gráfico 38 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produção de carotenoides totais por <i>A. platensis</i> e <i>Spirulina labyrinthiformis</i> em fontes amoniacais	180
Gráfico 39 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, $X$ ( $g.L^{-1}$ ) por <i>A. platensis</i>	181
Gráfico 40 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, $X$ ( $g.L^{-1}$ ) por <i>A. platensis</i>	182
Gráfico 41 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, $X$ ( $g.L^{-1}$ ) por <i>A. platensis</i>	182
Gráfico 42 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa, $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) de <i>A. platensis</i>	183
Gráfico 43 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa, $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) de <i>A. platensis</i>	184
Gráfico 44 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produtividade em biomassa, $Q_x$ ( $g.L^{-1}.d^{-1}$ ) de <i>A. platensis</i>	184
Gráfico 45 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniacal, EF (%), por <i>A. platensis</i>	185

Gráfico 46 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%), por <i>A. platensis</i>	185
Gráfico 47 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%), por <i>A. platensis</i>	186
Gráfico 48 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L-1) por <i>A. platensis</i>	187
Gráfico 49 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L-1) por <i>A. platensis</i>	187
Gráfico 50 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L-1) por <i>A. platensis</i>	188
Gráfico 51 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	189
Gráfico 52 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	190
Gráfico 53 – Teste t de Student dos dados do parâmetro eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	190
Gráfico 54 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro total de amônia consumida dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	191
Gráfico 55 – Teste t de Student dos dados do parâmetro total de amônia consumida dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	192
Gráfico 56 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro ficocianina na biomassa dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	193
Gráfico 57 – Teste t de Student dos dados do parâmetro ficocianina na biomassa dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L <sup>-1</sup>	193
Gráfico 58 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	194

Gráfico 59 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	195
Gráfico 60 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	196
Gráfico 61 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	197
Gráfico 62 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	197
Gráfico 63 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	198
Gráfico 64 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final da biomassa de <i>A. platensis</i> do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	199
Gráfico 65 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração final da biomassa de <i>A. platensis</i> do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	200
Gráfico 66 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro produtividade em biomassa de <i>A. platensis</i> do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	201
Gráfico 67 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produtividade em biomassa de <i>A. platensis</i> do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	201

Gráfico 68 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final de bactérias heterotróficas do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	202
Gráfico 69 – Teste t de Student dos dados do parâmetro concentração final de bactérias heterotróficas do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	203
Gráfico 70 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Acúmulo de ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	204
Gráfico 71 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Acúmulo de ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	204
Gráfico 72 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração de ficocianina na cultura ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	205
Gráfico 73 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração de ficocianina na cultura ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	206
Gráfico 74 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro proteínas totais na biomassa (%) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	207
Gráfico 75 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro proteínas totais na biomassa (%) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial	207
Gráfico 76 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro acúmulo de PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por <i>A. platensis</i>	208
Gráfico 77 – Teste t de Student dos dados do parâmetro acúmulo de PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por <i>A. platensis</i>	209

- Gráfico 78 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Ficocianina na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 210
- Gráfico 79 – Teste t de Student dos dados do parâmetro Ficocianina na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 211
- Gráfico 80 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Ficocianina na cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 212
- Gráfico 81 – Teste t de Student dos dados do parâmetro Ficocianina na cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 213
- Gráfico 82 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro proteínas totais (%) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 214
- Gráfico 83 – Teste t de Student dos dados do parâmetro proteínas totais (%) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 214
- Gráfico 84 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro PHA na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 215
- Gráfico 85 - Teste t de Student dos dados do parâmetro PHA na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual 216

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Exemplos de estudos acerca do acúmulo de PHA por microrganismos em diferentes condições de cultivo	53
Tabela 1.2 - Exemplos de nutrientes presentes em diferentes efluentes tratados por digestão anaeróbica e seu potencial para compor meios de baixo custo para produção de microalgas e cianobactérias. O símbolo (-) indica que não foi encontrada a informação do parâmetro no estudo indicado	63
Tabela 1.3 - Características do glicerol coproduto da produção de biodiesel na forma bruta, parcialmente refinada e do glicerol puro e comercial	64
Tabela 3.1 – Composição do meio BG-11	72
Tabela 3.2 – Composição do meio Zarrouk modificado por George (1976)	72
Tabela 4.1 – Produtividade em biomassa e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal das três cianobactérias estudadas em diferentes concentrações de sulfato de amônio e condição de controle em nitrato de sódio. Os dados da tabela são mostrados com desvio padrão. As letras diferentes de uma mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os dados analisados pelo teste de Tukey (alfa de 0,05)	101
Tabela 4.2 – Exemplos de estudos relacionados à remoção de nitrogênio amoniacal por microalgas e cianobactérias	103
Tabela 4.3 – Parâmetros da produção de <i>Arthrospira platensis</i> em 0,6 g.L <sup>-1</sup> de sulfato de amônio após 6 d de crescimento. Diferentes concentrações iniciais de biomassa foram comparadas avaliando-se também o efeito da aclimatação na produtividade da biomassa e no consumo de nitrogênio amoniacal. X representa a concentração final de biomassa e Qx a produtividade volumétrica de biomassa. Os resultados de cada parâmetro (X, Qx, NH <sub>3</sub> consumido e eficiência de remoção de NH <sub>3</sub> ) com desvio padrão foram analisados separadamente pelo teste de Tukey (alfa de 0,05). Letras diferentes de um mesmo parâmetro representam diferenças estatisticamente significativas entre os dados analisados	110
Tabela 4.4 – Parâmetros de produção de <i>Arthrospira platensis</i> e de pigmentos (carotenoides e ficocianina) em experimentos conduzidos por batelada alimentada. Os símbolos de erro representam o desvio padrão. CE (%) é a eficiência de conversão de nitrogênio amoniacal em biomassa de <i>A. platensis</i> e EF é a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal	115
Tabela 4.5 – Parâmetros dos experimentos com <i>A. platensis</i> conduzidos por batelada alimentada com e sem Glicerol bruto residual e em diferentes concentrações de nutrientes das soluções de alimentação. Onde X é a concentração final de biomassa e EF é a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal. As letras diferentes dos dados de um mesmo parâmetro representam que há diferenças estatisticamente significativas entre os dados conforme o teste de Tukey	124

Tabela 4.6 – Principais resultados do bioprocesso desenvolvido para assimilação de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas e compostos de interesse industrial produzidos. Onde X é a concentração final de células; Qx a produtividade volumétrica em biomassa e EF é a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal. Letras diferentes nos dados comparados de um parâmetro representa diferença estatisticamente significativa entre os dados	134
Tabela 4.7 – Comparação das bandas resultantes da análise de FTIR do biopolímero produzido no bioprocesso desenvolvido às bandas características do PHB reportadas na literatura	139
Tabela 4.8 – Estudos recentes relacionados à remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes por tratamento biológico com microalgas. * Dados estimados com base nas informações contidas no artigo. O símbolo ( ) expressa a informação não encontrada nos artigos citados	143
Tabela 4.9 – Diferentes estudos com estratégias recentes para melhorar a remoção de nitrogênio amoniacal por processos de nitrificação, desnitrificação e Anammox. * Dados estimados com base nas informações contidas no artigo. O símbolo ( ) expressa a informação não encontrada nos artigos citados	146
Tabela 4.10 – Resumo das condições experimentais para produção de <i>A. platensis</i> em diferentes composições de luz	165
Tabela 4.11 – Resultados da produção de biomassa e PHA por <i>A. platensis</i> por batelada sequencial (em dois estágios) em LED rosa e branco	168

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
APC	Aloficocianina
ATP	Trifosfato de adenosina
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DFD	Densidade de fluxo fotônico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória de varredura
EF	Eficiência de remoção
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GS	Glutamina sintase
GOGAT	Glutamato sintase
GPC	Cromatografia de permeação em gel
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação iônica
PE	Ficoeritrina
PHA	Polihidroxialcanoatos

PLA	Poli(3-hidroxi-butirato)
rpm	Rotações por minuto
TGA	Análise Termogravimétrica

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	32
<b>1.1 Métodos físico-químicos convencionais para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes industriais e suas implicações</b> .....	32
1.1.1 <u>Efluentes com elevada concentração de nitrogênio amoniacal</u> .....	32
1.1.2 <u>Tratamentos químicos e físico-químicos para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes</u> .....	33
<b>1.2 Tratamentos biológicos convencionalmente utilizados para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes</b> .....	33
1.2.1 <u>Nitrificação e desnitrificação</u> .....	33
1.2.2 <u>Nitrificação parcial seguida do processo Anammox</u> .....	35
<b>1.3 Biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes por microalgas e cianobactérias</b> .....	38
<b>1.4 Estratégias recém utilizadas para diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para cianobactérias</b> .....	41
<b>1.5 O potencial de cianobactérias para viabilidade da biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes industriais: produção de compostos de interesse industrial</b> .....	44
1.5.1 <u>O Potencial biotecnológico de <i>A. platensis</i>: produção de ficobiliproteínas, carotenoides e biopolímeros</u> .....	45
<b>1.6 A produção potencial de biopolímeros pelas cianobactérias: implicações do uso de polímeros obtidos por rota petroquímica para produção de plásticos</b> .....	48
<b>1.7 Principais características dos polihidroxicarboxilatos</b> .....	51
<b>1.8 O estado da arte da produção dos polihidroxicarboxilatos</b> .....	52
<b>1.9 Principais aspectos de um bioprocessos para produção de polihidroxicarboxilatos e principais rotas metabólicas envolvidas em sua produção por cianobactérias</b> .....	55
<b>1.10 O potencial do uso de resíduos como o glicerol bruto residual da produção de biodiesel e de efluentes da digestão anaeróbica para produção de cianobactérias e produção de PHA</b> .....	62
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	66
2.1 <b>Estrutura da pesquisa</b> .....	66
2.2 <b>Justificativa</b> .....	67
2.3 <b>Hipóteses do presente estudo</b> .....	68
2.4 <b>Objetivo geral</b> .....	69
2.5 <b>Objetivos específicos</b> .....	69

<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	71
3.1 <b>Manutenção das cianobactérias</b> .....	71
3.2 <b>Comparação do cultivo de cianobactérias em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal</b> .....	73
3.3 <b>Comparação de estratégias para melhor aproveitamento do nitrogênio amoniacal por <i>Arthrospira platensis</i>: aumento de inóculo e aclimatação celular</b> .....	75
3.4 <b>Avaliação do efeito da condução do bioprocesso por batelada alimentada na assimilação do nitrogênio amoniacal por <i>A. platensis</i></b> .....	76
3.5 <b>Avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i>, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial</b> .....	79
3.6 <b>Avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual: experimentos em garrafas de 5 L</b> .....	82
3.7 <b>Caracterização dos polihidroxicarboxilatos</b> .....	85
3.7.1 <u>Difratometria de Raios-X (DRX)</u> .....	85
3.7.2 <u>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</u> .....	85
3.7.3 <u>Calorimetria exploratória de varredura – DSC</u> .....	85
3.7.4 <u>Análise Termogravimétrica – TGA</u> .....	86
3.7.5 <u>Cromatografia de permeação em gel – GPC</u> .....	86
3.8 <b>Determinações analíticas</b> .....	86
3.8.1 <u>Determinação da concentração de biomassa</u> .....	87
3.8.2 <u>Determinação da concentração de ficocianina</u> .....	88
3.8.3 <u>Determinação da concentração de carotenoides totais</u> .....	89
3.8.4 <u>Determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato</u> .....	90
3.8.5 <u>Estimativa da perda da amônia por evaporação</u> .....	92
3.8.6 <u>Quantificação de proteínas totais e nitrogênio (N) na biomassa</u> .....	93
3.8.7 <u>Quantificação de glicerol e caracterização do Glicerol Bruto Residual</u> .....	94
3.8.8 <u>Quantificação de biopolímeros (polihidroxicarboxilatos)</u> .....	96
3.8.9 <u>Estimativa da Densidade de Fluxo Fotônico (D.F.F) dos experimentos</u> .....	97
3.9 <b>Análises estatísticas</b> .....	99
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	100
4.1 <b>Comparação do cultivo de cianobactérias em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal</b> .....	100

4.2 Comparação de estratégias para melhor aproveitamento do nitrogênio amoniacal por <i>Arthrospira platensis</i> : aumento de inóculo e aclimatação celular.....	109
4.3 Avaliação da mudança do modo de condução do bioprocesso para batelada alimentada para assimilação do nitrogênio amoniacal por <i>A. platensis</i> .....	112
4.4 Avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de <i>Arthrospira platensis</i> , assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial.....	121
4.5 Avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual: experimentos em garrafas de 5 L .....	131
<b>CONCLUSÃO</b> .....	150
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	151
<b>APÊNDICE</b> - Avaliação da produção de polihidroxialcanoatos em diferentes composições de luz por <i>Arthrospira platensis</i> .....	164

## INTRODUÇÃO

O lixiviado de aterro sanitário, assim como os efluentes municipais, de destilarias e diversos efluentes agroindustriais (bovinocultura, avicultura, criação de búfalos, suinocultura, etc.) são tratados por digestão anaeróbica visando reduzir a carga orgânica do efluente. No entanto, durante a digestão anaeróbica, efluentes que podem conter 1.000-3.000 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal são produzidos. Para evitar a eutrofização dos corpos hídricos, a legislação brasileira define 20 mg.L<sup>-1</sup> como a concentração aceitável de nitrogênio amoniacal em efluentes industriais (CONAMA, Resolução nº 430 de 13 de maio de 2011). Ainda assim, os processos economicamente viáveis para remover as elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal desses efluentes estão atualmente em desenvolvimento (MEEGODA et al., 2018; NAN et al., 2019; SEKINE et al., 2020; SCHELIGA; TEIXEIRA; CALDERARI, 2021).

Assim, é necessário desenvolver estratégias para obter um processo viável para remoção de nitrogênio amoniacal desses efluentes tratados por digestão anaeróbica. De acordo com Tzanakakis et al. (2021), garantir a qualidade dos recursos hídricos é o principal desafio do século XXI para a longevidade da sociedade no planeta, pois a escassez de recursos hídricos potáveis já afeta a saúde de 4 bilhões de pessoas no mundo (TZANAKAKIS; PARANYCHIANAKIS; ANGELAKIS, 2020).

O processo biológico mais tradicional para remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes é a nitrificação-desnitrificação sequencial. A nitrificação consiste na oxidação do amônio a nitrito seguida pela oxidação do nitrito a nitrato por bactérias nitrificantes autotróficas. Posteriormente, no processo de desnitrificação, as bactérias heterotróficas desnitrificantes reduzem o nitrato e produzem N<sub>2</sub> por meio de reações sequenciais (AKIZUKI et al., 2020; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020; SENA et al., 2021).

Devido às diferenças no tipo de metabolismo desses microrganismos envolvidos, geralmente são necessários diferentes reatores para o tratamento do efluente. Além disso, a aeração necessária na etapa de nitrificação e a adição de metanol na desnitrificação heterotrófica aumentam significativamente os custos operacionais. Posteriormente, melhorias relevantes foram alcançadas com o desenvolvimento da nitrificação parcial (produção de nitrito) seguida do processo anammox com a produção de N<sub>2</sub> (RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020; SALBITANI; CARFAGNA, 2021).

É importante destacar que esse processo biológico pode demandar entre 30-100 dias para a aclimação dos microrganismos ao efluente e para aumentar a eficiência de remoção do

nitrogênio amoniacal. Além disso, há uma alta produção desses micro-organismos durante a biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes e seu destino é preocupante para as indústrias (CONNAN et al., 2018; SHAO et al., 2018; ZENG et al., 2018 SHEN et al., 2020).

Diante disso, os métodos biológicos utilizando cianobactérias têm sido estudados como uma alternativa para a biorremediação de nitrogênio amoniacal de efluentes. As cianobactérias consomem o nitrogênio amoniacal e convertem essa fonte de nitrogênio diretamente em proteínas e na produção de biomassa. Isso faz com que não haja a produção de nitrato e nitrito como intermediários. É possível, dessa forma, tratar o efluente em um único reator e simplificar o bioprocessamento. Além disso, a produção das cianobactérias envolvidas no bioprocessamento durante o tratamento do efluente não é um problema para as indústrias, pois os seguintes produtos de interesse industrial podem ser extraídos dessas biomassas: pigmentos de elevado valor agregado, como ficobiliproteínas (\$ 500/kg) e carotenóides (\$ 3,00–\$ 25,00/mg), proteínas para fertilizantes de liberação controlada e biopolímeros (polihidroxialcanoatos) para produção de plásticos biodegradáveis (LIMA et al., 2018; LIU et al., 2018; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020).

O obstáculo para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes por cianobactérias é a toxicidade do nitrogênio amoniacal para esses micro-organismos. Quando a concentração de amônia predomina no equilíbrio entre amônia e amônio, a amônia se difunde através das membranas celulares e atinge o tilacóide. A elevada concentração de amônia no tilacóide prejudica o aparato fotossintetizante da cianobactéria. A concentração de amônia livre é elevada no meio quando o pH aumenta ao longo do cultivo, sendo o principal parâmetro a ser controlado no bioprocessamento como estratégia para diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal (DRATH et al., 2008).

Estudos recentes têm demonstrado que a inserção de uma fonte de carbono orgânico no meio amoniacal tem aumentado a independência do uso do aparato fotossintetizante (afetado pela toxicidade do nitrogênio amoniacal) pelas cianobactérias para produção de energia. Isso tem aumentado sua eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes (SANKARAN; PREMALATHA, 2018; LI et al. 2019). Este estudo foi inovador ao avaliar o uso do glicerol bruto, residual da produção de biodiesel, como fonte de carbono orgânico para estimular o metabolismo mixotrófico das cianobactérias e aumentar sua assimilação de nitrogênio amoniacal de meios amoniacais.

O Brasil está entre os três maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo. Aproximadamente, o volume de glicerol bruto gerado é 10% do volume de biodiesel produzido, sendo gerado, no Brasil, cerca de 640 mil toneladas de glicerol bruto em 2020. A fonte de

carbono é o componente de maior custo do meio de produção de cianobactérias. Utilizar um resíduo como fonte de carbono teria um aspecto favorável sob o ponto de vista econômico (relacionado ao menor custo com o meio de produção) e ambiental ao sugerir um destino para o glicerol bruto residual de biodiesel. Além disso, o segundo componente mais importante do meio de produção de cianobactérias é a fonte de nitrogênio por serem biomassas ricas em proteínas. Dessa forma, haveria uma redução de custo com o meio de produção das cianobactérias através da utilização de fontes amoniacais disponíveis em efluentes industriais (DE CARVALHO et al., 2019; CHILAKAMARRY et al., 2021; EPE; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2021).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um bioprocesso inovador para remoção de nitrogênio amoniacal de meios amoniacais com glicerol bruto residual de biodiesel por cianobactérias. Utilizou-se outras estratégias de forma sinérgica e inovadora de modo a conter a toxicidade do nitrogênio amoniacal para cianobactérias: controle do pH, aumento da concentração inicial de biomassa (MARKOU et al., 2014); mixotrofia (LI et al., 2019) e condução por batelada alimentada (SOLETTO et al., 2005; MARKOU, 2015b). A primeira hipótese do presente estudo é que a sinergia entre as estratégias mencionadas em um único bioprocessos implica em um aumento da eficiência da remoção do nitrogênio amoniacal pelas cianobactérias.

Outro aspecto importante é que a mixotrofia também induz a produção de compostos de reserva de energética, como os biopolímeros precursores da produção de plásticos biodegradáveis, pelos micro-organismos produtores. Porém, o aspecto dificultoso para estimular a produção dos biopolímeros durante a biorremediação do nitrogênio amoniacal é que baixas concentrações de nitrogênio são necessárias para o acúmulo de polihidroxialcanoatos pelas cianobactérias (PHALANISONG; PLANGKLANG; REUNGSANG, 2021). Nesse sentido, a segunda hipótese do presente estudo consiste no suprimento de nitrogênio amoniacal por batelada alimentada para os micro-organismos cultivados em um inóculo elevado favorecer o acúmulo de biopolímeros. Ao se utilizar um inóculo elevado, concentrações cada vez maiores de nitrogênio amoniacal podem ser alimentadas no sistema e ainda assim ser uma concentração limitante para os micro-organismos. Isso pode ser entendido pelo fato de haver muitas células competindo pela fonte nitrogenada.

A terceira hipótese é a das bactérias heterotróficas, que cresceriam junto às cianobactérias mediante a presença da fonte orgânica, também produzirem componentes ácidos capazes de diminuir o pH do meio e favorecer a prevalência de amônio em relação à amônia. Essa seria uma forma de baixo custo de controlar o pH do sistema e diminuir a toxicidade da

amônia para os micro-organismos envolvidos na biorremediação do nitrogênio amoniacal. Sendo assim, o objetivo central do trabalho é desenvolver um bioprocesso econômico para biorremediação do nitrogênio amoniacal de meios amoniacaais por cianobactérias e bactérias heterotróficas, em presença de glicerol bruto residual, com produção concomitante de biopolímeros e outros pigmentos de interesse industrial.

## **1 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **1.1 Métodos físico-químicos convencionais para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes industriais e suas implicações**

#### **1.1.1 Efluentes com elevada concentração de nitrogênio amoniacal**

Em relação às etapas geralmente necessárias para adequabilidade de efluentes, após o tratamento preliminar, que visa à transformação de objetos de maior tamanho em partículas menores para posterior separação, é realizado o tratamento primário. Nessa etapa, os sólidos suspensos e compostos orgânicos são removidos parcialmente dos efluentes por processos de coagulação e floculação. Posteriormente, é realizado o tratamento secundário que consiste na redução da matéria orgânica biodegradável até níveis aceitáveis de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) por processos biológicos, através da ação de micro-organismos que metabolizam esses compostos orgânicos (RAZZAK et al., 2017)

No entanto, na produção de aves, bovinos, búfalos e suínos, por exemplo, pelos animais possuírem uma dieta rica em proteínas, em que entre 50 a 80% da fonte nitrogenada é excretada, faz com que haja, no efluente, elevadas concentrações de ureia e ácido úrico (aproximadamente 70% do efluente). Esses compostos excretados são metabolizados durante o tratamento secundário e convertidos a nitrogênio amoniacal, presente em elevadas concentrações (WIJESINGHE, 2017; FUCHS et al., 2018)

Dessa forma, além do nitrogênio amoniacal estar presente em elevadas concentrações no efluente do cultivo de bovinos, aves, búfalos e suínos (podendo haver mais de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal), essa fonte nitrogenada também está presente em elevadas concentrações no lixiviado de aterro sanitário, como também, em efluentes municipais e de destilarias. Elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal em efluentes levam à eutrofização dos corpos hídricos, que consiste no favorecimento do crescimento de plantas e algas no ambiente de descarga, o que leva a queda da concentração de oxigênio dissolvido nos corpos hídricos e a mortandade de peixes, micro-organismos e demais organismos por hipóxia (KOUTRA; GRAMMATIKOPOULOS; KORNAROS, 2017; RAZZAK et al., 2017). Visando evitar tal problemática, no Brasil, a Resolução 430 de 2011, do CONAMA estabelece limites para concentração de nitrogênio amoniacal nos efluentes industriais dependendo de suas

características, sendo de  $20 \text{ mgN.L}^{-1}$  o limite permitido para concentração de nitrogênio amoniacal.

### **1.1.2 Tratamentos químicos e físico-químicos para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes**

Os processos físico-químicos com potencial de uso como tratamento terciário para remoção de N-amoniacoal em efluentes, como, por exemplo, o uso de membranas ou adsorção em zeólitas, possuem viabilidade ainda limitada pelo custo elevado. Um processo físico-químico convencionalmente utilizado para remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes consiste na precipitação química através formação da estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ). Para que ocorra a reação, compostos químicos são adicionados no efluente, para que haja a proporção adequada entre nitrogênio, magnésio e fósforo, além de NaOH, para que se obtenha o pH necessário para reação. Entretanto, Sena et. al. (2021) aborda a complexidade do custo operacional envolvido nesse processo além de sérios impactos ambientais decorrentes da adição dos químicos e do destino da estruvita que é formada durante o processo (MOHD UDAIYAPPAN et al., 2017; SENA et al., 2021).

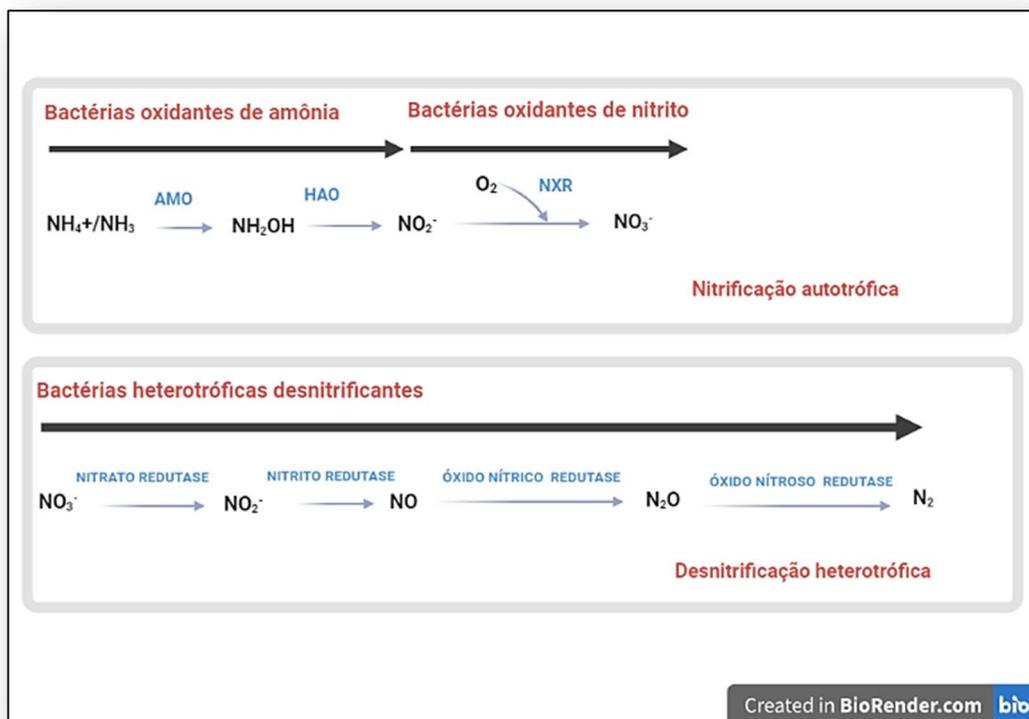
## **1.2 Tratamentos biológicos convencionalmente utilizados para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes**

### **1.2.1 Nitrificação e desnitrificação**

Devido as desvantagens previamente mencionadas dos métodos físico-químicos, alternativas baseadas em processos biológicos têm sido amplamente estudadas e empregadas. O processo biológico mais tradicionalmente utilizado para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes consiste na nitrificação seguida da desnitrificação. A nitrificação autotrófica é realizada por micro-organismos quimioautotróficos. Inicialmente, ocorre a oxidação do nitrogênio amoniacal a nitrito através das bactérias oxidantes de amônia em um

processo aeróbico. O nitrito é posteriormente oxidado a nitrato pelas bactérias oxidantes de nitrito (Figura 1A). As bactérias desnitrificantes, por sua vez, em reações sequenciais, em heterotrofia e anaerobiose, reduzem o nitrato até a produção de  $N_2$ . As bactérias oxidantes de amônia são constituídas majoritariamente pelos seguintes gêneros *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* e *Nitrosolobus* enquanto os gêneros *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, *Nitrolancea* são usualmente encontrados no grupo das bactérias oxidantes de nitrito. Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são os mais comumente encontrados entre as bactérias desnitrificantes (ARRIAGADA et al., 2017; PISHGAR et al., 2019; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020).

Figura 1 – Processos biológicos convencionais utilizados para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes



Legenda: AMO é a enzima amônia monooxigenase; HAO: hidroxilamina oxidoreductase; NXR; nitrito oxidoreductase.

Fonte: Adaptado de RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020.

Como os diferentes grupos de micro-organismos envolvidos na nitrificação e na desnitrificação requerem diferentes condições de cultivo, tais processos exigem uma elevada tecnicidade por ser mais favorável que haja reatores distintos para nitrificação e desnitrificação.

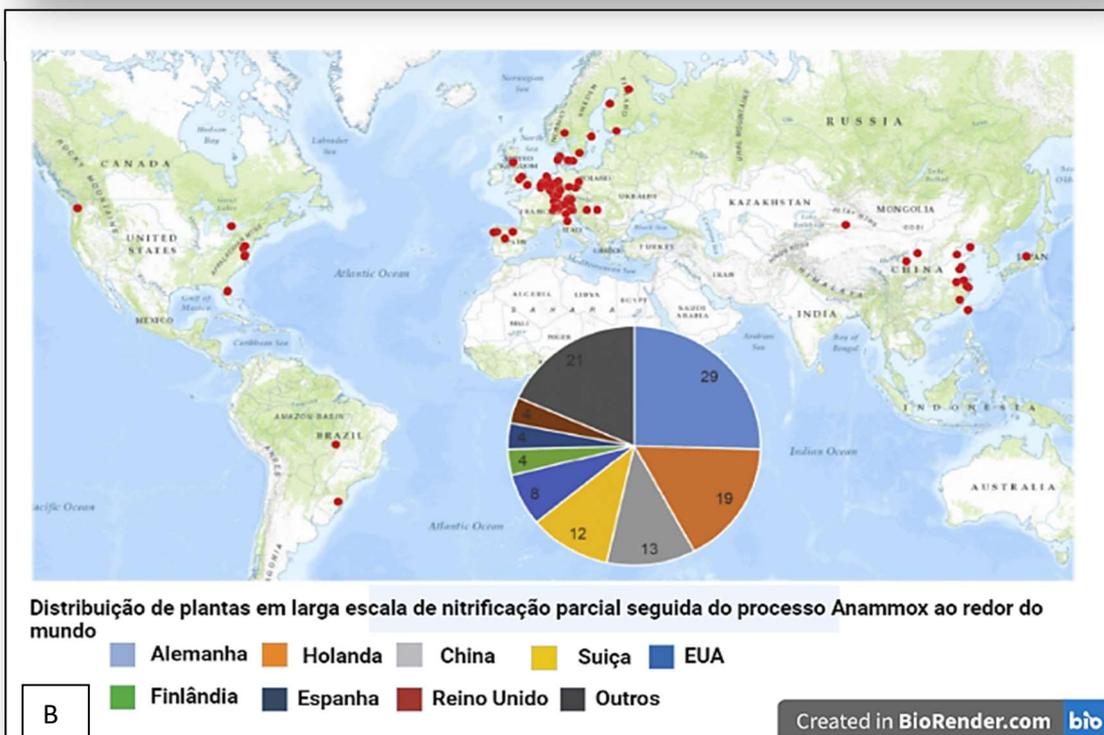
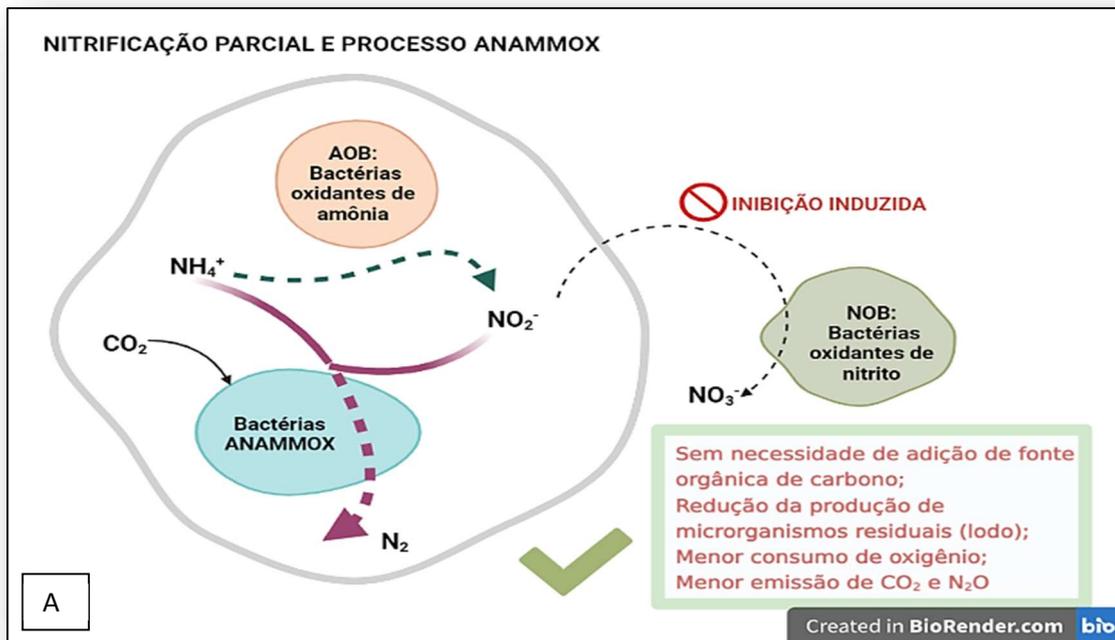
Isso aumenta, de forma significativa, o custo para o tratamento do efluente. Além disso, o produto do crescimento das bactérias e seu destino são preocupantes para as indústrias já que não há vasta aplicação biotecnológica da biomassa produzida além de sua utilização como biofertilizante. Isso tem levado ao desenvolvimento de processos biológicos alternativos para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes (RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020; CUI; CUI; HUANG, 2021).

### 1.2.2 Nitrificação parcial seguida do processo Anammox

No processo de nitrificação parcial seguido da etapa Anammox, inicialmente, o nitrogênio amoniacal é oxidado parcialmente até a formação de nitrito pelas bactérias oxidantes de amônia em um processo aeróbico. Posteriormente, o nitrogênio amoniacal remanescente no efluente junto ao nitrito recém produzido é convertido a  $N_2$  pelas bactérias envolvidas no processo anammox em autotrofia e anaerobiose. Esse processo é possibilitado pela repressão das atividades metabólicas das bactérias oxidantes de nitrito, que continuariam o processo de nitrificação através da conversão do nitrito a nitrato. Os seguintes parâmetros têm sido ajustados para desfavorecer o crescimento das bactérias oxidantes de nitrito, Figura 2A: pH, 7,5 a 8,5; temperatura, maior que  $25^{\circ}C$ ; oxigênio dissolvido,  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; uso de inibidores como cloridrato de hidroxilamina, aumento da concentração de compostos orgânicos, entre outros (CONNAN et al., 2018; GUO et al., 2020; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020; WU et al., 2020).

Em comparação ao processo de nitrificação seguido da desnitrificação, o processo anammox proporcionou avanços na biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes pelas seguintes vantagens: não necessita de adição de fonte de carbono orgânico; redução de 80% da produção de micro-organismos residuais (lodo) durante o processo; menor consumo de energia e redução de 60% do consumo de oxigênio requerido durante o bioprocessamento. As bactérias usualmente envolvidas no processo anammox são das espécies *Candidatus Brocadia anammoxidans* e *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* (RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020).

Figura 2 – Nitrificação parcial seguida do processo Anammox



Legenda: A supressão do crescimento das bactérias oxidantes de nitrito como estratégia para favorecer a nitrificação parcial seguida do processo anammox (A). Distribuição de plantas Anammox para o tratamento de efluentes industriais ao redor do mundo em 2015 (B).

Fonte: Adaptado de RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020 (A); ALI; OKABE, 2015 (B).

A principal desvantagem do processo anammox é que, segundo a estequiometria da reação, o nitrato é formado como intermediário, podendo haver a conversão em nitrato correspondente a 11% da carga de nitrogênio amoniacal presente no efluente. Tal fato faz com que seja necessária uma etapa posterior de desnitrificação para o processo. Ainda assim, em 2015, já havia 114 instalações de larga escala para o tratamento de efluentes pelo processo anammox ao redor do mundo, com a capacidade de tratamento de 134 toneladas de nitrogênio por dia, Figura 2B (ALI; OKABE, 2015; CONNAN et al., 2018; GUO et al., 2020; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020; WU et al., 2020).

Rahimi et. al. (2020) relatam a presença estimada de 100 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal e 50 mg.L<sup>-1</sup> de nitrato em grande parte das plantas de tratamento de efluentes pelo processo anammox. Além disso, a concentração de fosfato presente no efluente pode inibir o processo anammox, sendo necessário um pré-tratamento para sua remoção. Ainda, o processo de nitrificação pode acarretar na produção de óxido nitroso, gás relacionado ao efeito estufa (CONNAN et al., 2018).

Devido aos desafios ainda existentes decorrentes da biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes a partir do processo anammox, diversas alternativas têm sido propostas tais como a nitrificação heterotrófica simultânea à desnitrificação aeróbica (ROUT; BHUNIA; DASH, 2017; CUI; CUI; HUANG, 2021) a nitrificação parcial integrada à desnitrificação (ZENG et al., 2018a); a nitrificação parcial simultânea ao processo anammox (CONNAN et al., 2018) e a nitrificação parcial simultânea ao processo anammox e à desnitrificação (ARRIAGADA et al., 2017; ZHANG et al., 2017).

Ainda que tais metodologias tenham sido propostas dada a diversidade metabólica dos micro-organismos envolvidos nas diversas vias metabólicas de assimilação do nitrogênio amoniacal, ainda é complexo o ajuste de diferentes condições necessárias para o sucesso desses bioprocessos. Isso faz com que ainda haja baixa eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal ou com que sejam necessários entre 30 e 200 dias para produção e aclimação dos micro-organismos envolvidos no bioprocessos. Além da biomassa produzida durante o tratamento não ter outras aplicações biotecnológicas além do potencial como biofertilizante (ARRIAGADA et al., 2017; ZHANG et al., 2017; ROUT; BHUNIA; DASH, 2017; CONNAN et al., 2018; ZENG et al., 2018; CUI; CUI; HUANG, 2021).

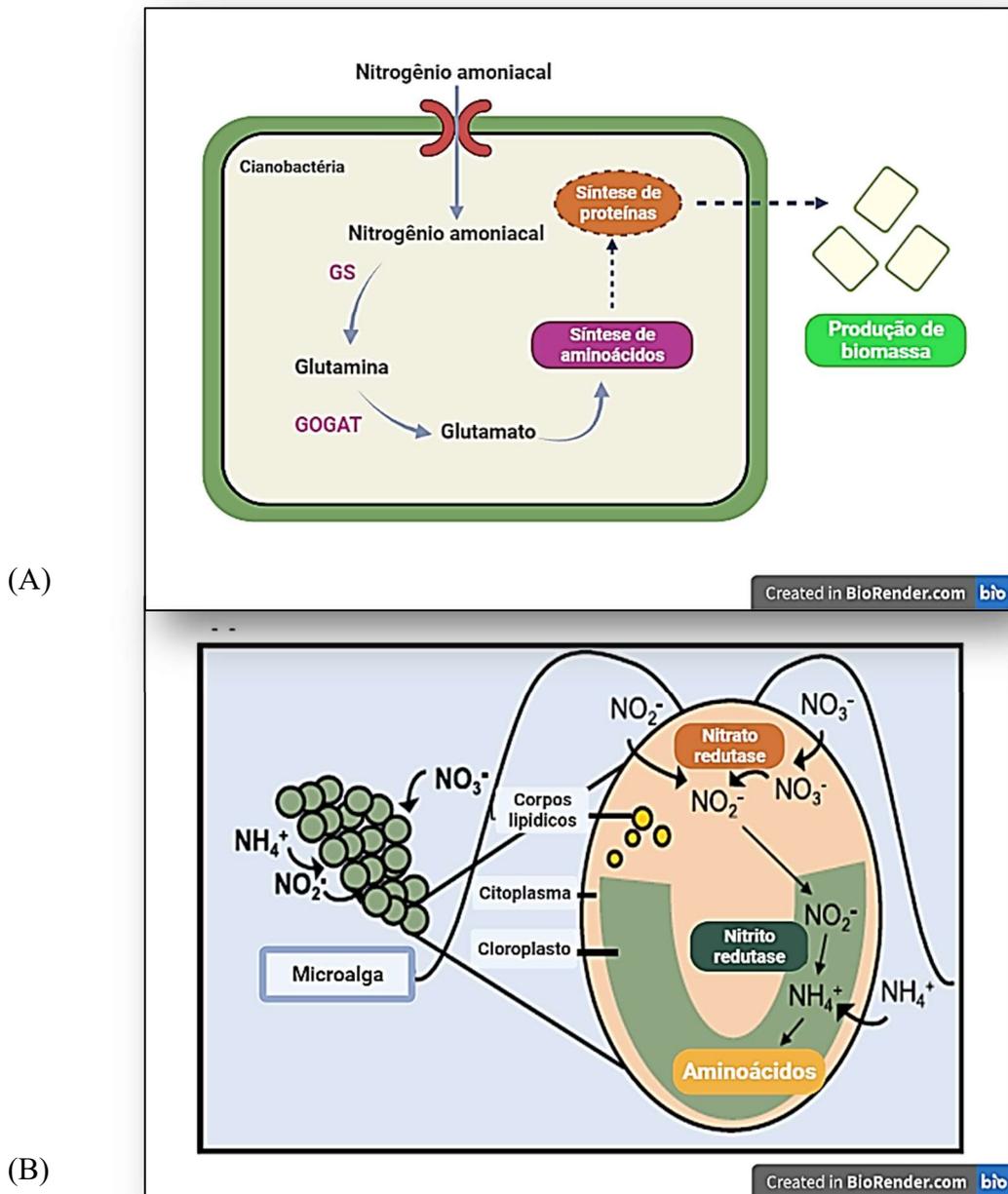
### 1.3 Biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes por microalgas e cianobactérias

As microalgas são constituintes do fito plâncton capazes de produzir diferentes compostos de elevado valor agregado através de diferentes fontes nitrogenadas, fontes inorgânicas de carbono como CO<sub>2</sub> atmosférico e em presença de luz. As cianobactérias são procariotas, também fazem parte do fito plâncton e possuem tais características previamente citadas. Um processo biológico que tem o potencial de diminuir, ou até mesmo eliminar, as desvantagens dos tratamentos biológicos convencionais, consiste no tratamento de efluentes com microalgas e cianobactérias. As microalgas e cianobactérias possuem uma grande versatilidade metabólica, sendo reconhecidamente capazes de consumir diferentes fontes de nitrogênio como, por exemplo, nitrito, nitrato e nitrogênio amoniacal (Figura 3A). As microalgas e cianobactérias consomem o nitrogênio amoniacal para síntese de aminoácidos (Figura 3B), incorporando a fonte nitrogenada em biomassa celular (TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017; ÁLVAREZ; OTERO, 2020; RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020).

Isso faz com que não ocorra a síntese de nitrito e nitrato intermediários, como acontece nos tratamentos biológicos convencionais para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes. Como a assimilação do nitrogênio amoniacal é, normalmente, realizada por um tipo de microalga ou cianobactéria e não há a necessidade de outras espécies de micro-organismos para remover formas intermediárias de nitrogênio produzidas, o tratamento pode ser realizado em um único fotobiorreator, o que simplifica a tecnicidade do tratamento do efluente e reduz seu custo (MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003; ACIÉN FERNÁNDEZ; GÓMEZ-SERRANO; FERNÁNDEZ-SEVILLA, 2018; SALBITANI; CARFAGNA, 2021).

O nitrogênio amoniacal é assimilado pelas microalgas e cianobactérias através da via GS-GOGAT (Figura 3B). O nitrogênio amoniacal é utilizado pela enzima glutamina sintase (GS) para realizar a amidação do glutamato e produzir glutamina em uma reação ATP dependente. Posteriormente, a enzima glutamato sintase (GOGAT) catalisa a redução do grupamento amida da glutamina a transferindo para o 2-oxoglutarato. Essa reação gera duas moléculas de glutamato, que é utilizado em vias metabólicas posteriores para síntese de aminoácidos e proteínas, havendo também a produção de biomassa celular (MURO-PASTOR; FLORENCIO, 2003; SALBITANI; CARFAGNA, 2021).

Figura 3 – Assimilação de diferentes fontes de nitrogênio por microalgas



Legenda: A diversidade de fontes de nitrogênio assimiláveis por microalgas (A). Via GS-GOGAT para assimilação de nitrogênio amoniacoal e conversão em aminoácidos. Onde: GS é a enzima glutamina sintase e GOGAT é a enzima glutamato sintase (B). Fonte Adaptado de: RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020 (A); Adaptado de SALBITANI; CARFAGNA, 2021(B).

Outro aspecto promissor é que quando os efluentes são tratados com microalgas e cianobactérias não há a problemática da geração de lodo (produto de crescimento do tratamento biológico) já que as biomassas de microalgas e cianobactérias são produtos biotecnológicos ricos em compostos de interesse industrial. Produzem, por exemplo, ácidos graxos utilizados para produção de biodiesel, proteínas para produção de fertilizantes, pigmentos de elevado valor

agregado para produção de tintas e polihidroxicanoatos, biopolímeros promissores para produção de plásticos biodegradáveis (KOUTRA; GRAMMATIKOPOULOS; KORAROS, 2017; MOHD UDAIYAPPAN et al., 2017).

As microalgas e cianobactérias possuem grande versatilidade em modos para obtenção de energia, incluindo os metabolismos fotoautotrófico, heterotrófico e mixotrófico. A forma mais comum para obtenção de energia entre as espécies de microalgas e cianobactérias é a fotoautotrofia. A fotoautotrofia consiste na produção de energia por esses micro-organismos através do consumo de fontes inorgânicas de carbono como o  $\text{CO}_2$  e da absorção de luz durante a fotossíntese. Algumas espécies de microalgas e cianobactérias obtêm energia através da heterotrofia. A heterotrofia envolve a assimilação de carbono orgânico e a produção de energia através da fosforilação oxidativa acompanhada do consumo de oxigênio como acceptor final de elétrons em ausência de luz (PEREZ-GARCIA; BASHAN, 2015).

A mixotrofia é quando as microalgas e cianobactérias são capazes de utilizar de forma simultânea fontes inorgânicas de carbono como o  $\text{CO}_2$  e orgânicas em presença de luz. O gás carbônico é fixado durante a fotossíntese de forma simultânea ao consumo de fontes orgânicas de carbono metabolizadas durante a respiração aeróbica. Algumas espécies também crescem alternando entre o modo fotoautotrófico e heterotrófico. Essa grande diversidade entre as formas para obtenção de energia pelas microalgas e cianobactérias faz com que possam ser desenvolvidos diferentes tipos de bioprocessos, com disponibilidade ou ausência de luz, podendo ser utilizados fotobiorreatores ou reatores em tanque agitado (PEREZ-GARCIA; BASHAN, 2015).

As microalgas e cianobactérias diversificam os compostos de interesse industrial produzidos de acordo com a forma utilizada para produção de energia. A indução ao metabolismo fotoautotrófico estimula a síntese de pigmentos de elevado valor agregado enquanto a heterotrofia e a mixotrofia resultam em um aumento da síntese de compostos de reserva energética como carboidratos, lipídeos e biopolímeros (LI et al., 2019).

O principal obstáculo para a biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes por microalgas e cianobactérias é a toxicidade da amônia para esses micro-organismos. A presença de amônia em relação ao íon amônio, que compõem o nitrogênio amoniacal, é dependente do pH do meio. Como a constante de dissociação iônica ( $\text{pK}_a$ ) do nitrogênio amoniacal é 9,25, quando o meio possui um pH superior a esse valor tem-se o predomínio de amônia no meio. A amônia é solúvel em lipídios e atravessa a membrana celular dos micro-organismos por difusão facilitada, o que aumenta sua assimilação, diferentemente do íon amônio. Drath e colaboradores (2008) estudaram os mecanismos de toxicidade da amônia em cianobactérias utilizando

*Synechocystis* sp como modelo. A integridade do fluxo de energia e do metabolismo das cianobactérias dependem diretamente das condições de seus centros de reação, que mediam a fotossíntese, denominados fotossistemas I e II. Esses centros de reação estão localizados no conjunto de membranas que compõem os tilacóides das cianobactérias (DRATH et al., 2008b; SALBITANI; CARFAGNA, 2021).

Durante a fotossíntese, ocorre o transporte de elétrons, mediado pela luz, nos fotossistemas, resultando na oxidação da água, produção de O<sub>2</sub>, redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH (que proporciona a produção de carboidratos) e na fosforilação do ADP a ATP. Dessa forma, como não há um mecanismo regulatório para controlar a assimilação da amônia na célula, elevadas concentrações intracelulares de amônia podem ser alcançadas. Isso ocorre através do aumento do transporte da amônia através dos tilacóides (DRATH et al., 2008b; SHEVELA; PISHCHALNIKOV; EICHACKER, 2013b).

Como consequência, o gradiente de prótons nos tilacóides é afetado, assim como a operação dos fotossistemas I e II, prejudicando o fluxo de energia necessário para conversão do ADP em ATP. Dessa forma, a produção de energia é extremamente afetada, prejudicando a fotossíntese e reduzindo o crescimento celular das cianobactérias (DRATH et al., 2008; MARKOU; MUYLAERT, 2016; TIAN et al., 2018).

Além disso, estudos recentes demonstram que a amônia livre induz o estresse oxidativo nas cianobactérias, o que leva ao acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam lipídios, DNA e proteínas. Esse consiste em outro fator que afeta significativamente o crescimento celular das cianobactérias quando produzidas em elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal (SHEN et al., 2020). Tal problemática levou a busca por estratégias, no presente estudo, que poderiam ser utilizadas para diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para as cianobactérias, visando possibilitar o desenvolvimento de um bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal pelas mesmas.

#### **1.4 Estratégias recém utilizadas para diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para cianobactérias**

A estratégia mais imediata consiste no controle do pH do bioprocesso através da adição de ácidos no efluente, como por exemplo o ácido clorídrico, com o intuito de manter o pH inferior a 9,25 (pKa do nitrogênio amoniacal) e favorecer a presença do íon amônio e diminuir

a presença de amônia, que é tóxica para as cianobactérias. Por outro lado, devido aos grandes volumes de efluentes a serem tratados essa estratégia requer um volume de ácido que pode inviabilizar a tecnicidade do bioprocessamento e elevar o seu custo (ARORA et al., 2021).

Baseando-se na grande diversidade entre as espécies de cianobactérias existentes, sendo estimada a presença de mais de 6.000 espécies, outra importante estratégia consiste na realização de análises comparativas, entre diferentes espécies de cianobactérias, quanto ao crescimento e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, em elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal. Com isso é possível obter o microrganismo mais adequado a ser utilizado no bioprocessamento para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes (FRANCHINO et al., 2013b; MASSA et al., 2017; TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017).

A estratégia de aclimação das cianobactérias, apesar de pouco estudada para essa finalidade, pode ser também uma alternativa a ser considerada. Tian et al. (2018) e Wang et al. (2018) propuseram a aclimação de microalgas a meios com elevadas concentrações de componentes tóxicos. A estratégia de aclimação consiste no aumento da tolerância através de cultivos sucessivos da microalga em um aumento gradual das concentrações do componente tóxico no meio a cada cultivo.

Markou et al. (2014) abordaram a estratégia de conduzir o bioprocessamento com elevada concentração inicial da espécie de cianobactéria utilizada. Ao utilizar um elevado inóculo é esperado que mais células estejam disponíveis para consumir o nitrogênio amoniacal, de forma mais rápida, até que se atinjam concentrações não tóxicas para cianobactéria, levando ao aumento da tolerância do microrganismo ao nitrogênio amoniacal.

A estratégia de inserir fontes orgânicas de carbono no efluente aumentou a assimilação do nitrogênio amoniacal por microalgas em Li et al. (2019). Isso ocorreu a partir do estímulo da microalga ao metabolismo mixotrófico. Tal fato pode ser explicado pela presença da fonte orgânica de carbono levar a uma maior independência do aparato fotossintetizante da microalga para produção de energia. Esse aspecto é favorável já que a eficiência da fotossíntese é prejudicada nas microalgas e cianobactérias devido a toxicidade do nitrogênio amoniacal. Muitos efluentes já possuem fontes de carbono orgânico, no entanto, sua concentração pode ser diminuída devido a diluição necessária do efluente no bioprocessamento, sendo necessárias fontes alternativas para suplementação no efluente. Outro aspecto importante é que o suprimento de fontes orgânicas de carbono tem favorecido vias de produção de compostos de reserva energética com potencial biotecnológico como ácidos graxos, para produção de biodiesel, e biopolímeros, para produção de plásticos biodegradáveis, nas microalgas e cianobactérias

respectivamente (RATNAPURAM; VUTUKURU; YADAVALLI, 2018; WANG; PRASAD; HIGGINS, 2019; PHALANISONG; PLANGKLANG; REUNGSANG, 2021).

Outra importante estratégia consiste em mudar o modo de condução do bioprocessamento para batelada alimentada. Ao invés de alimentar o sistema com toda concentração de nitrogênio amoniacal a ser consumida no início do cultivo da cianobactéria, como ocorre em batelada simples, ocorre a inserção da fonte de nitrogênio, em menor concentração, porém em frequentes alimentações de acordo com a taxa de consumo do micro-organismo. Dessa forma, concentrações de nitrogênio amoniacal menos tóxicas para as cianobactérias podem ser utilizadas no bioprocessamento. Essa estratégia tem sido utilizada para aumentar a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal de efluentes nos seguintes estudos: SOLETTO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011; CRUZ-MARTÍNEZ et al., 2015b; MARKOU, 2015a; LI et al., 2019b.

Foi observado, durante o desenvolvimento do presente estudo, que muitas estratégias eram utilizadas de forma isolada nos estudos existentes. Um exemplo é o uso da mixotrofia utilizando-se uma baixa concentração inicial de células (LI et al., 2019c); ou diferentes bioprocessos conduzidos por batelada alimentada, porém, sem a suplementação de uma fonte de carbono orgânica para as microalgas e cianobactérias (SOLETTO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011; CRUZ-MARTÍNEZ et al., 2015a; MARKOU, 2015a). Dessa forma, na primeira fase do primeiro estudo, buscou-se verificar qual estratégia seria mais adequada para favorecer um bioprocessamento conduzido por batelada alimentada para assimilação de nitrogênio amoniacal por cianobactérias. Inicialmente, comparou-se a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal entre três espécies de cianobactérias em busca de uma espécie mais tolerante. Posteriormente, a estratégia da aclimação celular das cianobactérias foi comparada a outra de iniciar o bioprocessamento com uma elevada concentração inicial de células.

A melhor das estratégias comparadas foi utilizada no desenvolvimento do bioprocessamento na segunda fase do estudo, em junção à mixotrofia e à condução por batelada alimentada. Dessa forma, propôs-se um bioprocessamento com sinergia entre as estratégias e avaliou-se a hipótese desse bioprocessamento aumentar a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal pelas cianobactérias. Na segunda fase do estudo, também foram avaliados os principais produtos de interesse industrial produzidos pela biomassa da cianobactéria produzida. A razão das cianobactérias serem utilizadas no presente estudo para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes junto ao seu potencial biotecnológico serão explanados no tópico a seguir.

### **1.5 O potencial de cianobactérias para viabilidade da biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes industriais: produção de compostos de interesse industrial**

Em relação à estudos realizados acerca do potencial biotecnológico de microalgas cultivadas em efluentes, Abinandan e Shanthakumar (2015) e Cheng *et al.* (2019) listam diversos exemplos de estudos com o objetivo de produção de ácidos graxos para biodiesel a partir de microalgas (ABINANDAN; SHANTHAKUMAR, 2015; CHENG *et al.*, 2019). Além disso, já existem empresas estabelecidas que atuam com a tecnologia de tratamento de efluentes por microalgas como, por exemplo, a Industrial Phycology (Reino Unido), além da Algae Systems (EUA), que agrega valor a biomassa de microalgas como fertilizantes e a Eldorado Biofuels (EUA), que produz biocombustíveis a partir de microalgas cultivadas em efluentes.

Os biopolímeros precursores da produção de plásticos biodegradáveis (polihidroxialcanoatos) são majoritariamente produzidos por bactérias e cianobactérias, havendo poucos relatos de sua produção por microalgas (TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017; ROJA *et al.*, 2019). Alguns estudos relacionados à produção de polihidroxialcanoatos em micro-organismos cultivados em efluentes têm sido realizados (CHAKRAVARTY; MHAISALKAR; CHAKRABARTI, 2010; TAMIS *et al.*, 2014; MORGAN-SAGASTUME *et al.*, 2016; LAM *et al.*, 2017; TAMANG *et al.*, 2019).

No entanto, esses biopolímeros, nesses estudos, não são produzidos a partir de cianobactérias, sendo produzidos por bactérias heterotróficas, não havendo, também, um enfoque na remoção de nitrogênio amoniacal dos efluentes nesses estudos. Diante do fato de haver poucos estudos que avaliam o potencial de cianobactérias para a biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes, como também, da produção concomitante de biopolímeros, o presente estudo teve o objetivo de avaliar se ambos os propósitos poderiam ser alcançados em um bioprocessos para biorremediação do nitrogênio amoniacal por cianobactérias.

Três espécies de cianobactérias foram escolhidas para o presente estudo: *Synechocystis* sp.; *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*. A primeira espécie citada foi escolhida por Ansari e Fatma (2016) mencionarem ser uma espécie promissora para produção de biopolímeros (polihidroxialcanoatos) a partir de um estudo comparativo entre diferentes espécies de cianobactérias. Como é possível verificar na Figura 4D, a espécie *Arthrospira platensis* possui maior tamanho em relação a *Synechocystis* sp. (Figura 4A). Isso favorece processos menos custosos como a filtração para recuperação da biomassa produzida. É

estimado que o custo para recuperação da biomassa represente de 20 a 30% do custo de sua produção, principalmente no caso de ser necessária a centrifugação (SINGH; PATIDAR, 2018).

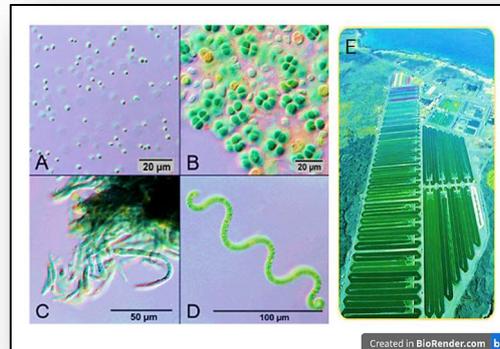
Esse fato, além de satisfatórias produtividades volumétrica em biomassa, da produção concomitante de pigmentos de elevado valor agregado, de biopolímeros e do elevado conteúdo proteico foram indicativos para a utilização de *A. platensis* no presente estudo (SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014; ZHOU et al., 2018). A última espécie, *Spirulina labyrinthiformis*, também é filamentosa, sendo fácil a sua separação do meio de produção. A espécie também foi escolhida por não ter havido, até então, relatos na literatura quanto ao seu potencial biotecnológico. Isso exemplifica mais uma característica inovadora do presente estudo. Em seguida serão explanadas as características dos principais compostos produzidos por *Synechocystis* sp. e *Arthrospira platensis*.

### **1.5.1 O Potencial biotecnológico de *A. platensis*: produção de ficobiliproteínas, carotenoides e biopolímeros**

A cianobactéria *A. platensis* já é produzida em escala industrial. Atualmente, tem sido comercializada como suplemento alimentar por seu elevado conteúdo proteico, podendo alcançar entre 55 a 70% de proteínas totais na biomassa. Além disso, é composta também por cerca de 6 a 10% de lipídios, 20% de carboidratos, é rica em minerais (como, por exemplo, K, Ca, Mg e Zn) e vitaminas (B1, B12, etc.), (VERNÈS et al., 2015).

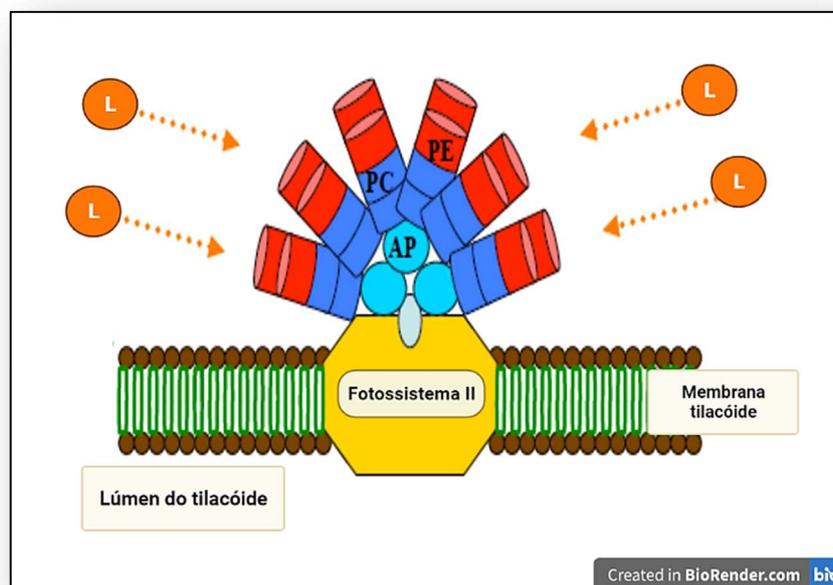
Dentre as proteínas presentes na *A. platensis*, destacam-se as ficobiliproteínas, que são pigmentos que proporcionam a fotossíntese por atuar na absorção de luz, permitindo a transferência de energia para o aparato fotossintetizante da cianobactéria (Figura 5). As ficobiliproteínas são classificadas em três grupos: ficocianina (apresenta coloração azul escuro), ficoeritrina (coloração vermelho escuro) e aloficocianina, de coloração verde azulada (VERNÈS et al., 2015).

Figura 4 – Diversidade morfológica de cianobactérias por microscopias de contraste interferencial diferencial (DIC) e ilustração da produção em larga escala de *Spirulina platensis*



Legenda: (A) *Synechocystis* sp.; (B) *Cyanosarcina* sp.; (C) *Calothrix* sp.; (D) *Arthrospira* sp.; (E) Demonstração da produção em larga escala de *Spirulina platensis*. Fonte: A, B, C e D: Adaptado de TROSCHL *et al.*, 2017.

Figura 5 – Organização do ficobilissoma em *A. platensis*



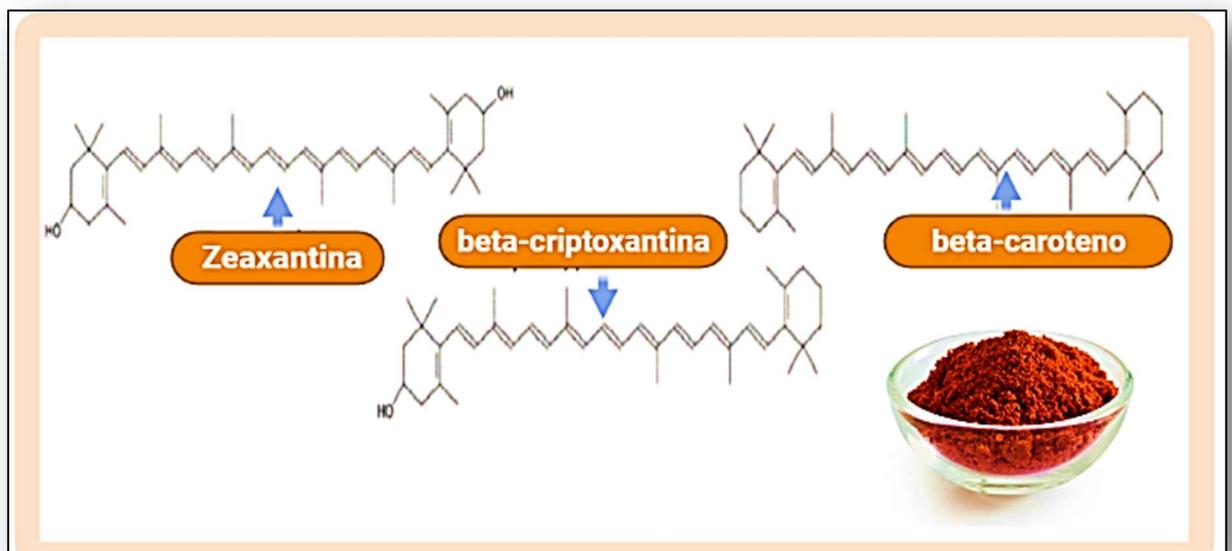
Legenda: Os pigmentos ficocianina (PC), ficoeritrina (PE) e aloficocianina (APC) constituem o ficobilissoma, que é um complexo macromolecular situado na superfície das membranas tilacóides, que absorvem luz (L) e proporcionam a fotossíntese em *A. platensis*. Fonte: Adaptado de VERNES *et al.*, 2015.

A ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina possuem absorção máxima a 620 nm, 540 nm e 650 nm, respectivamente. São pigmentos solúveis em água, de fácil extração e apresentam

bastante fluorescência. Dentre as ficobiliproteínas a ficocianina é a mais abundante e pode representar 20% do peso seco da biomassa de *A. platensis* produzida. A ficocianina tem sido utilizada amplamente nos setores de cosméticos e farmacêuticos devido as suas propriedades anti-inflamatórias. O mercado anual de ficocianina alcançou cerca de 5 a 10 milhões de dólares em 2015, sendo um pigmento de elevado valor agregado (US\$ 500/Kg), (VERNÈS et al., 2015; (LIMA et al., 2018).

Além das ficobiliproteínas, a *A. platensis* pode acumular cerca de 2% de sua massa seca em clorofila. Esse acúmulo em clorofila é cerca de 10 vezes maior em relação a clorofila produzida pelos vegetais terrestres, devido a elevada eficiência fotossintetizante das cianobactérias. As cianobactérias também acumulam carotenoides como beta caroteno, zeaxantina e beta criptoxantina (Figura 6). Os carotenoides são pigmentos naturais com propriedades lipofílicas e possuem uma variedade em sua coloração: vermelha, laranja e amarela. Esses pigmentos, quando purificados, possuem um elevado valor agregado (3-25\$/mg) e são utilizados como corantes naturais no ramo alimentício devido as suas propriedades nutricionais (LIMA et al., 2018; MARZORATI et al., 2019).

Figura 6 – Carotenoides produzidos por *Spirulina platensis*



Legenda: Estruturas dos carotenóides Zeaxantina, beta-criptoxantina e beta-caroteno

Fonte: Adaptado de MARZORATI et al., 2019.

No entanto, como pode ser observado, as aplicações mais usuais das ficobiliproteínas e dos carotenoides são ligadas ao ramo alimentício, cosmético e farmacêutico. Como a proposta do presente estudo envolve a produção de biomassa de *A. platensis* a partir de efluentes industriais essas aplicações seriam restringidas. Por outro lado, devido a problemática ambiental do uso de corantes sintéticos para fabricação de tintas, utilizadas no setor têxtil por exemplo, há uma crescente busca pelo uso de corantes naturais para essa finalidade (PATEL, 2011). Um exemplo é a empresa americana Living Ink que produz embalagens com logomarcas impressas a partir de tintas produzidas por microalgas. Outro exemplo consiste no Algaemy Project, que é um projeto que visa incentivar o uso, por empresas alemãs, de pigmentos produzidos por microalgas no setor têxtil.

Dessa forma, a produção de pigmentos por microalgas cultivadas em efluentes industriais é promissora. Considerando o fato das ficobiliproteínas serem pigmentos proteicos, uma elevada assimilação de nitrogênio amoniacal pode favorecer seu acúmulo nas cianobactérias. Além disso, seu percentual em proteínas totais favorece seu uso como fertilizantes sustentáveis de liberação lenta. Outro potencial de *A. platensis*, como também da *Synechocystis* sp. utilizada no presente estudo, é a produção de biopolímeros precursores da produção de plásticos biodegradáveis. O potencial da produção dos polihidroxialcanoatos (biopolímeros) pelas cianobactérias será explanado nos tópicos a seguir (KOUTRA; GRAMMATIKOPOULOS; KORNAROS, 2017; COSTA et al., 2018; KAEWDAM et al., 2019).

### **1.6 A produção potencial de biopolímeros pelas cianobactérias: implicações do uso de polímeros obtidos por rota petroquímica para produção de plásticos**

Segundo Thakur *et al.* (2018), plásticos são polímeros sintéticos com diferentes tipos de estrutura como poliestireno, polietileno, poliuretano, polipropileno, polietileno tereftalato, poliolefinas, entre outros. Devido às propriedades dos plásticos obtidos por rota petroquímica, como por exemplo, baixa densidade, durabilidade, baixo custo, serem facilmente moldáveis, esses polímeros têm sido amplamente utilizados na sociedade, nos setores de eletrônicos, embalagem de materiais, agricultura e automobilístico, por exemplo. Por conta disso, o uso de plásticos na vida cotidiana tem crescido em taxa significativa mundialmente: 1,65 a 311 milhões

de toneladas no período de 1950 a 2014, respectivamente. (THAKUR et al., 2018; LASKAR; KUMAR, 2019).

Os plásticos que têm como matéria-prima os compostos fósseis desempenharam um papel importante no estabelecimento de processos e produtos que transformaram a sociedade moderna. Por outro lado, vêm trazendo inúmeros problemas ambientais como consequência de sua baixa biodegradabilidade. Sua baixa biodegradabilidade é consequência de suas características estruturais que dificultam a ação das enzimas despolimerases, excretadas por micro-organismos presentes nos meios onde são depositados. Desta forma, podem permanecer no ambiente por mais de 2000 anos e já ocupam cerca de 20% do volume de aterros. Além disso, é estimado um acúmulo nos oceanos de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas por ano e um aumento de uma ordem de grandeza em 2025 (ROSTKOWSKI, 2012; BANO et al., 2017; CORDIER; UEHARA, 2019).

Visando evitar tal problemática, as alternativas visando diminuir o acúmulo de artefatos plásticos após seu consumo incluem a reciclagem, a pirólise e a incineração. Países como Brasil, que possuem a menor taxa de reciclagem entre os materiais que podem ser recicláveis, ainda não possuem uma gestão eficiente dos resíduos sólidos, sendo descartados inadequadamente, agravando os impactos negativos destes materiais ao meio ambiente (CAMPOS, 2016; OTTONI, 2016).

A pirólise, apesar de ser uma tecnologia avançada de tratamento térmico e passível de ser aplicada para a degradação dos polímeros presentes nesses materiais plásticos, necessita de uma gestão prévia e adequada desses resíduos para separação desses compostos. Essa gestão prévia é necessária já que plásticos com diferentes características podem afetar de forma significativa as características dos produtos desse processo (líquidos, sólidos e gasosos). Além disso, a pirólise demanda um elevado custo tanto operacional para o seu estabelecimento e uma logística é necessária para o transporte desses resíduos. Esses fatores têm dificultado a implementação da pirólise em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Já a incineração desses polímeros faz com que seu processo de combustão resulte na liberação de clorodibenzodioxinas (dioxinas) e clorodibenzofuranos (furanos), componentes de elevada toxicidade, sendo, inclusive, carcinogênicos (VANAPALLI et al., 2019).

Sendo assim, os impactos ambientais proporcionados pela sua utilização, ao longo dos anos, muitos irreversíveis, e a instabilidade do preço do barril de petróleo por fatores geopolíticos, têm mobilizado ampla conscientização nos setores acadêmicos, sociais e governamentais, resultando na busca pela inclusão de meios mais sustentáveis nesta almejada mudança de paradigma. Desta forma, mudanças no início da cadeia produtiva de plásticos são

necessárias, sendo a substituição gradativa do uso de polímeros obtidos por rota petroquímica por biopolímeros biodegradáveis uma promissora alternativa (MARTINS et al., 2014; PAVLIUKH et al., 2020; FOUAD, 2022).

Os biopolímeros são polímeros sintetizados por diferentes tipos de organismos. Na natureza, há uma ampla variedade de biopolímeros com diferentes características moleculares e propriedades funcionais. São categorizados em dois grupos abrangentes sendo biopolímeros biodegradáveis ou não biodegradáveis (NIAOUNAKIS, 2014; SMITH; MOXON; MORRIS, 2016).

Biopolímeros biodegradáveis podem ser definidos por suas características estruturais serem suscetíveis a ação enzimática de micro-organismos ou suscetíveis a degradação em processos de fotodegradação, oxidação e hidrólise. Os biopolímeros decompõem-se, principalmente em dióxido de carbono, metano e compostos inorgânicos em um curto período de tempo (em comparação ao longo período de degradabilidade dos polímeros petroquímicos). Vários tipos de biopolímeros são produzidos a partir de fontes renováveis a curto período, ao contrário dos polímeros obtidos por rota petroquímica. Dentre esses, podem ser exemplificados plásticos, produzidos a partir de biomassas agrícolas, como acetato de celulose, ésteres de amido, e o PLA (plástico de poliácido láctico), produzido a partir de milho (VERMA; FORTUNATI, 2019).

No entanto, o uso dessas biomassas agrícolas, de alta importância para a dieta alimentar ou para a produção de biocombustíveis, faz com que o custo desses biopolímeros (produzidos a partir dessas biomassas) seja influenciado pelo mercado desses produtos. Além disso, há preocupações que concernem o uso da área agriculturável para estes fins. Outra preocupação é à intensa utilização da água potável, já que a irrigação, nos países desenvolvidos, já consome mais de 60% dos recursos hídricos disponíveis (VELASCO-MUÑOZ et al., 2018; VERMA; FORTUNATI, 2019).

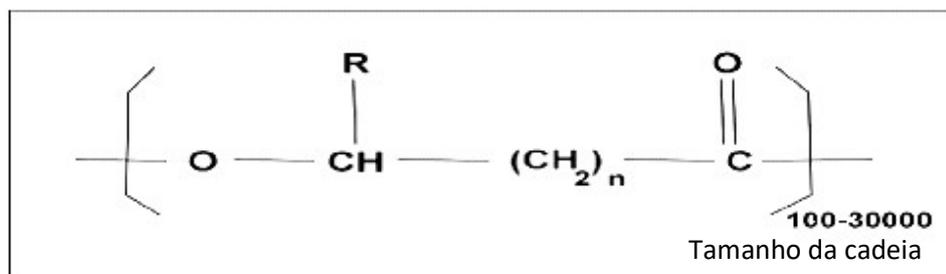
Diante disso, os estudos que envolvem a produção de polihidroxialcanoatos (PHA) tem se destacado. Os polihidroxialcanoatos são biopolímeros que podem ser produzidos por micro-organismos, como cianobactérias por exemplo, através do consumo de gás carbônico atmosférico durante a fotossíntese (COSTA et al., 2018c). Isso faz com que não haja, nesse cenário, as implicações inerentes, mencionadas previamente, do uso de biomassas vegetais para produção de biopolímeros.

## 1.7 Principais características dos polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHA) são biopolímeros sintetizados por micro-organismos em formas granulares e intracelulares como forma de armazenamento de energia. A estrutura geral dos PHA pode ser visualizada na Figura 7. Ao se observar a Figura 7, quando a posição “R” é substituída por um radical metil, tem-se o poli-3-hidroxi-butirato, P3HB (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

Este é o PHA mais estudado e comercializado mundialmente por suas características termoplásticas e mecânicas serem muito similares às do polipropileno. Dependendo do número de átomos de carbono presente na unidade monomérica, os PHA podem ser divididos em grupos com polímeros de cadeia curta, quando a unidade monomérica possui menos de cinco átomos de carbono, polímeros de cadeia média, com 5 a 14 átomos ou de cadeia longa com mais de 14 átomos. Justificado por tal variedade, mais de 150 diferentes tipos de monômeros já foram observados quando sintetizados por diferentes micro-organismos (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

Figura 7 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos



Legenda: Dois principais exemplos de PHA podem ser demonstrados a seguir. Onde se  $n=1$  e  $R=\text{metil}$  tem-se poli (-3-hidroxi-butirato); se  $R = \text{hidrogênio}$ : poli (-3-hidroxi-propionato).

Fonte: Adaptado de RAZA et al., 2018.

Esses biopolímeros são insolúveis em água, possuem resistência a hidrólise, sendo também resistentes a luz ultravioleta. Atingem profundidades em água que facilitam sua biodegradação anaeróbica em sedimentos. Os PHA, dependendo de suas características estruturais, são completamente degradados até água e dióxido de carbono em condições aeróbicas ou metano e dióxido de carbono em condições anaeróbicas por micro-organismos

produtores de PHA-depolimerases, presentes nos mais diversos ambientes. Em ambientes aquáticos, tem sido reportada a biodegradabilidade em 254 dias, em temperaturas até 60°C. Os PHA também são biocompatíveis, o que caracteriza ausência de produção de compostos tóxicos resultantes da biodegradação (ANJUM et al., 2016; RAZA; ABID; BANAT, 2018).

A temperatura de transição vítrea dos PHA varia de -50 a 4°C. Essa propriedade é importante para o processamento dos polímeros e suas posteriores aplicações, já que consiste em uma faixa entre o estado rígido ou fluido do polímero. Abaixo da temperatura de transição vítrea, a energia disponível é insuficiente para permitir a mobilidade coordenada das moléculas, caracterizando sua rigidez. Já acima dessa temperatura, há mobilidade nas moléculas e flexibilidade dos polímeros. A temperatura de fusão varia de 40 a 180°C, enquanto outros fatores como a temperatura de termodegradação variam de acordo com o tipo de polímero produzido e a composição de sua unidade monomérica (RAZA; ABID; BANAT, 2018).

Em relação às possíveis aplicações, estima-se que os PHA possam ser utilizados na produção de artefatos plásticos convencionais como frascos, filmes, recipientes, garrafas, sacolas, emulsificantes, borrachas e itens de higiene descartáveis, por exemplo. Podem, também, ser matéria prima para a produção de tintas e adesivos. Ressaltam-se, também, outras diversas aplicações industriais, tais como transportadores biodegradáveis para liberação controlada de fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas, etc. Observa-se, com isso, não somente a disponibilidade de um vasto mercado para produção dos PHA, mas, principalmente, a necessidade de uma maior inclusão de polímeros biodegradáveis na cadeia produtiva, como resultado dos dados impactantes de acúmulo dos plásticos petroquímicos (CAMPOS, 2016; GARCÍA, 2016; KUSHWAH; KUSHWAH; SINGH, 2016; LAM et al., 2017).

## **1.8 O estado da arte da produção dos polihidroxialcanoatos**

Os polihidroxialcanoatos são produzidos e armazenados de forma intracelular por diferentes espécies de bactérias, como forma de armazenamento de energia. Normalmente, são inclusões esféricas, com diâmetro de 0.2-0.7 µm, envoltas por membranas compostas por, aproximadamente, 2% de proteínas e 0,5% de lipídios (RAZA; ABID; BANAT, 2018; ARUMUGAM, 2020).

O Poli(3-hidroxiбутирато), tipo de PHA mais conhecido e estudado, foi o primeiro a ser descoberto, em 1926, pelo microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur em Paris.

Durante os 30 anos seguintes, havia interesse em pesquisas acerca de métodos para estimar a concentração dos PHA produzidos e as melhores condições para o cultivo dos microrganismos produtores. Nos anos 70, houve pesquisas e inserções de patentes referentes a diferentes processos de produção de PHA. Atualmente, estima-se que microrganismos de mais de 90 gêneros sejam capazes de acumular esses poliésteres (ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2018).

A Tabela 1.1, adaptada de Albuquerque e Malafaia (2018) e Costa et al. (2019), exemplificam acúmulos de polihidroxicanoatos obtidos por diferentes espécies de bactérias e cianobactérias, em diferentes condições utilizadas para produção de biomassa. Pode-se observar que resultados próximos a 80% de acúmulo podem ser alcançados por determinadas espécies produtoras em metabolismo heterotrófico. Diante disso, atualmente, a produção de polihidroxicanoatos já se encontra em escala comercial, sendo produzidos e comercializados por diferentes empresas.

Tabela 1.1- Exemplos de estudos acerca do acúmulo de PHA por microrganismos em diferentes condições de cultivo

Grupo	Microrganismo	Condição de cultivo e fonte de carbono	Acúmulo (%)	Referência bibliográfica
A	<i>Cupriavidus necator</i>	Adição de glicerol bruto e hidrolisado de farinha de colza. Cultivo em batelada alimentada	55,6	GARCÍA et al., 2013
	<i>Cupriavidus necator</i> geneticamente modificada	Adição de glicose. Cultivo em batelada alimentada	77,4	ZHANG et al., 2015
	<i>Zobellella denitrificans</i>	Adição de glicerol. Cultivo em batelada alimentada	66,9	IBRAHIM; STEINBÜCHEL, 2009
	<i>E. coli</i> geneticamente modificada	Adição de soro de queijo. Cultivo em batelada alimentada em limitação de oxigênio	80	KIM, 2000
B	<i>Synechococcus</i> sp. MA19	Cultivo em deficiência de fósforo, aerado em 2% (v/v) de CO <sub>2</sub> a 100 mL/min	55	NISHIOKA et al., 2001
	<i>Spirulina platensis</i>	Adição de acetato e CO <sub>2</sub>	10	TOH et al., 2008

<i>Synechocystis</i> sp.	Cultivo em deficiência de fósforo e nitrogênio	11	PANDA et al., 2006
<i>Nostoc muscorum</i>	Cultivo agitado por aeração e em deficiência de fósforo	69	BHATI; MALLICK, 2015
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	Cultivo agitado por aeração e em deficiência de nitrogênio	12	COSTA et al., 2018

Legenda: Grupo A é constituído por bactérias e Grupo B por cianobactérias. O acúmulo (%) corresponde ao peso de PHA/peso de biomassa. Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE & MALAFAIA, 2018 e COSTA *et al.*, 2019.

As seguintes empresas produtoras de PHA são exemplificadas: Bio-on (Itália), Biological Material Polyone (China), Ianjin Green Bioscience Co. (China), Ltd., Jiangsu NantianGroup (China), Metabolix (EUA), Procter & Gamble Co., Ltd. (EUA) e Goodfellow Cambridge, Ltd., empresa situada no Reino unido (ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2018). No entanto, plásticos constituídos de polihidroxialcanoatos ainda apresentam custo cerca de cinco vezes mais elevado (US\$2.25–2.75/lb) do que plásticos compostos por polipropileno.

Justifica-se esse custo elevado para produção pelos PHA serem produzidos comercialmente por bactérias heterotróficas, que requerem fontes de carbono custosas como glicose, por exemplo, em elevadas quantidades, como também sais minerais. Esse fator é responsável por aproximadamente 50% dos custos totais necessários para produção dos PHA. Dessa forma, quando comparada à produção de plásticos produzidos por polímeros obtidos em rota petroquímica, a produção de polihidroxialcanoatos ainda é limitada por seu custo elevado (KOURMENTZA et al., 2017; COSTA et al., 2019).

Além disso, essas fontes de carbono orgânico (como glicose por exemplo), utilizadas para produção de bactérias produtoras de PHA, são obtidas a partir de biomassas agrícolas, sendo seu uso atrelado à problemática, mencionada previamente, da utilização de biomassas agrícolas para essa finalidade. Dessa forma, estratégias para produção de PHA em meios de baixo custo, principalmente relativo ao valor da fonte de carbono utilizada, são essenciais para manter a viabilidade econômica de sua produção. Nesse contexto, a produção de PHA a partir da produção de cianobactérias tem sido proposta. Justifica-se a produção de PHA por cianobactérias por serem capazes de produzir PHA, utilizando fontes de carbono inorgânicas menos custosas, como CO<sub>2</sub> atmosférico (MEIXNER et al., 2018; COSTA et al., 2019).

Recentemente, alguns estudos têm sido publicados acerca da produção de polihidroxialcanoatos por micro-organismos heterotróficos cultivados em efluentes industriais. Os estudos de Heepkaew e Suwannasilp (2020), Almeida et al. (2021); Conca et al. (2020); Mulders et al. (2020) e Passanha et al. (2013) alcançaram acúmulos promissores de PHA na biomassa produzida de 21,8%; 30,8%; 46,8%; 61% e 90%, respectivamente. No entanto, nesses estudos, não há um bioprocesso desenvolvido para remoção concomitante de nitrogênio amoniacal em elevadas concentrações. Isso faz com que sejam necessários estudos que aliem as duas propostas. Para que o bioprocessos do presente estudo pudesse ser desenvolvido foi necessário entender a rota metabólica da produção dos PHA pelas cianobactérias e os fatores influentes para o aumento do seu acúmulo em PHA. Ambas as abordagens serão explanadas nos tópicos a seguir.

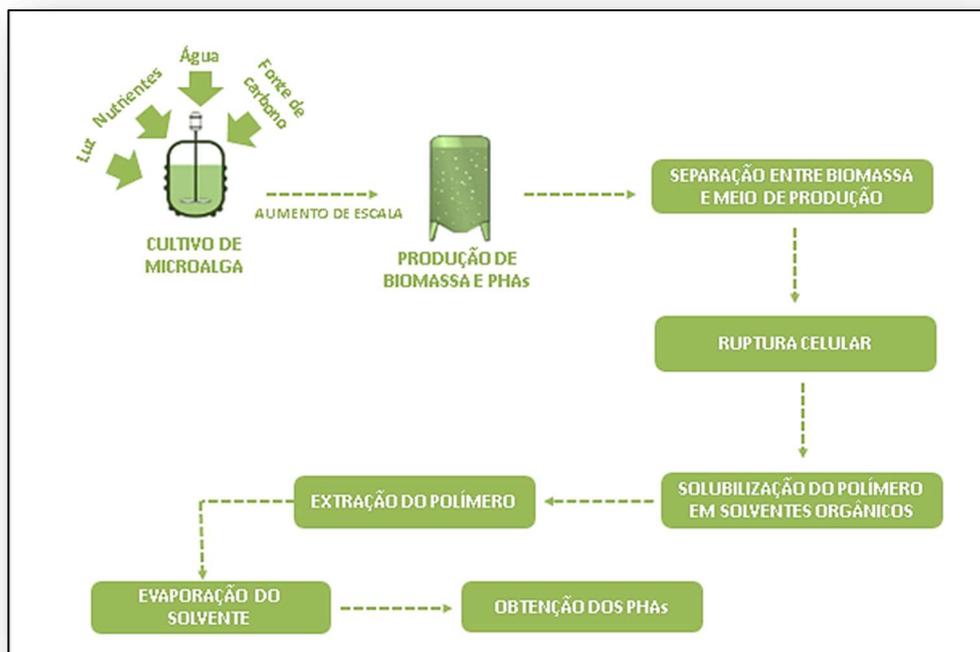
### **1.9 Principais aspectos de um bioprocessos para produção de polihidroxialcanoatos e principais rotas metabólicas envolvidas em sua produção por cianobactérias**

A produção de polihidroxialcanoatos envolve várias etapas, resumidas na Figura 8, que representa um exemplo de bioprocessos que pode ser utilizado para produção de PHA. Inicialmente, ocorre o ajuste de parâmetros influentes para o crescimento da biomassa celular e para o acúmulo de PHA. Podem ser exemplificados como parâmetros a disponibilidade de luz e o tipo de fonte de carbono utilizada para produção, já que influenciam na produção de biomassa por metabolismo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico (ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2018).

Numa primeira etapa é produzida biomassa em menor escala, para obtenção de inóculo para posterior produção de biomassa e PHA em maior escala. Após a produção da biomassa nesta maior escala é necessário que haja um processo eficiente para separação da biomassa do meio de produção utilizado, como a filtração por exemplo. Após a recuperação da biomassa e sua secagem, é necessária a ruptura celular, para proporcionar a extração dos polihidroxialcanoatos, por métodos químicos, enzimáticos ou físico-químicos. Apesar do uso de solventes orgânicos como clorofórmio serem tradicionalmente utilizados para posterior solubilização dos PHA (entre 60-80°C), iniciativas vêm crescendo em alguns estudos, que avaliam a utilização de compostos alternativos e menos tóxicos para extração desses

biopolímeros. Após o processo de solubilização e extração dos PHA ocorre a evaporação do solvente. Posteriormente, utiliza-se álcoois para precipitação dos biopolímeros de modo a possibilitar sua recuperação, posterior, por secagem (COSTA et al., 2018; JIANG et al., 2018; MANNINA et al., 2020).

Figura 8 – Esquema de um bioprocesso para produção de polihidroxicanoatos a partir de cianobactérias



Legenda: Resumo das principais etapas envolvidas de um bioprocesso para produção de polihidroxicanoatos a partir de cianobactérias.

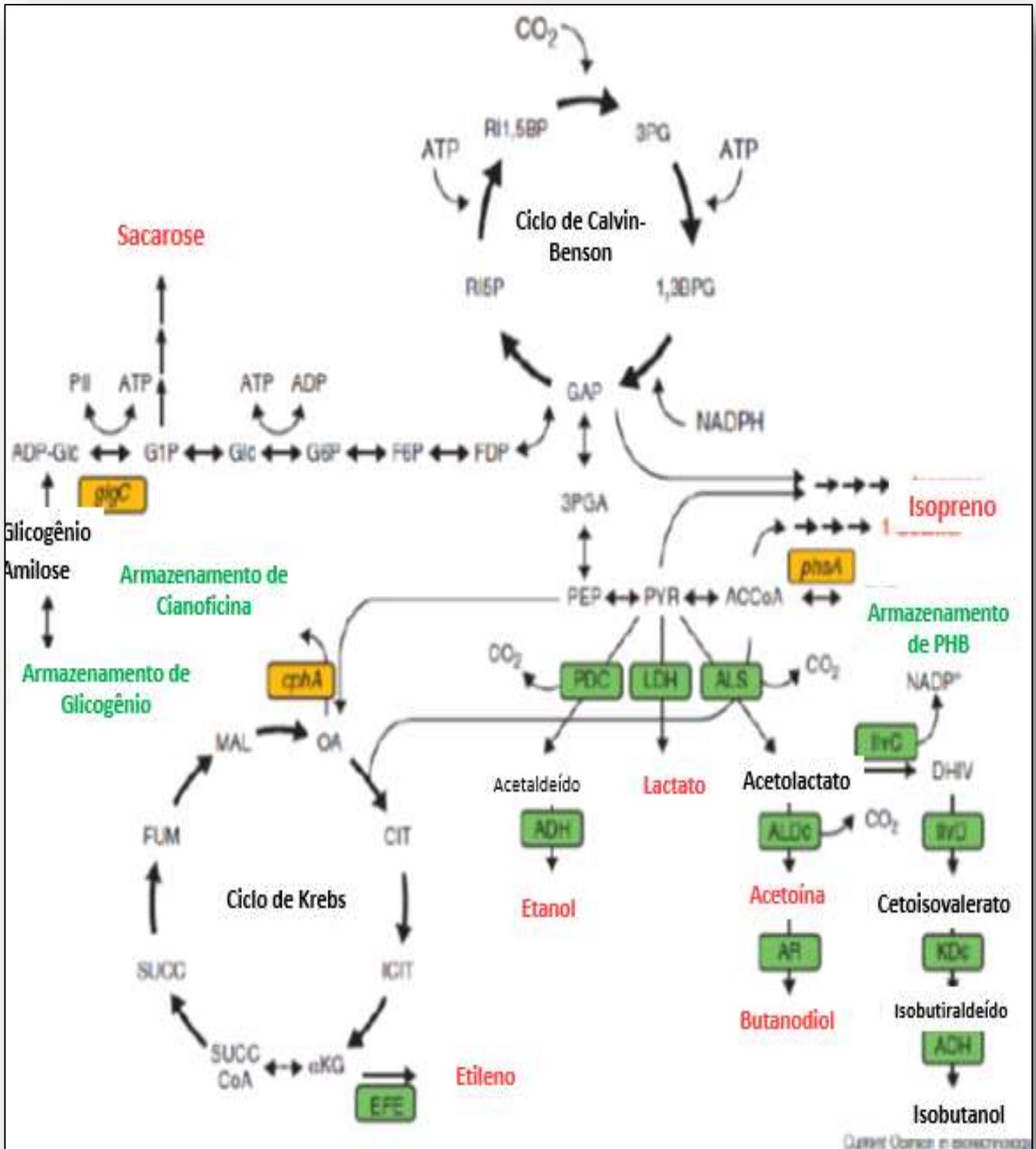
Adaptado de: ALBUQUERQUE; MALAFAIA, 2018 e KAMRAVAMANESH; LACKNER; HERWIG, 2018.

De modo a se obter um maior acúmulo de PHA por cianobactérias é necessário um entendimento da bioquímica de produção de polihidroxicanoatos pelas mesmas e os fatores influentes para sua produção. Um dos parâmetros que favorece a via metabólica para produção de polihidroxicanoatos em cianobactérias é a limitação nutricional no meio de cultivo. Principalmente, quando se atinge concentrações baixas (limitantes) de nitrogênio. Nessas condições, no entanto, não há favorecimento de vias metabólicas que culminam em síntese de proteínas e, conseqüentemente, em produção de biomassa celular. Diante disso, pode haver acúmulo favorável de polihidroxicanoatos em baixas concentrações de biomassa celular produzidas (TROSCHL et al., 2017).

Em concentrações limitantes de nitrogênio, há uma queda da concentração de coenzima A e a necessidade de equilibrar a concentração intracelular das formas reduzidas e oxidadas de NADP<sup>+</sup>, o que favorece, portanto, vias de síntese de PHA (Figuras 9 e 10). O metabolismo de poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), tipo de PHA produzido por cianobactérias, é iniciado na fase escura da fotossíntese, em presença de fontes orgânicas de carbono produzidas na fase clara da fotossíntese, oriundas do ciclo de Calvin-Benson, Figura 10 (COSTA et al., 2018a; COSTA et al., 2018b; COSTA et al., 2019).

Esse ciclo é favorecido pela razão ATP/NADPH de 1,5, o que justifica a presença dessas vias metabólicas alternativas em microrganismos fotoautotróficos, de modo a manter a razão favorável entre ATP e NADPH. A biossíntese de poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) tem como precursor a molécula acetil-coenzima A, ocorrendo em três estágios (Figura 10). Inicialmente, a acetoacetil-CoA é produzida a partir de duas moléculas de acetil-CoA em condensação pela ação da enzima beta-cetotiolase.

Figura 9- Exemplos de vias metabólicas de *Synechocystis* PCC6803 para produção de PHA

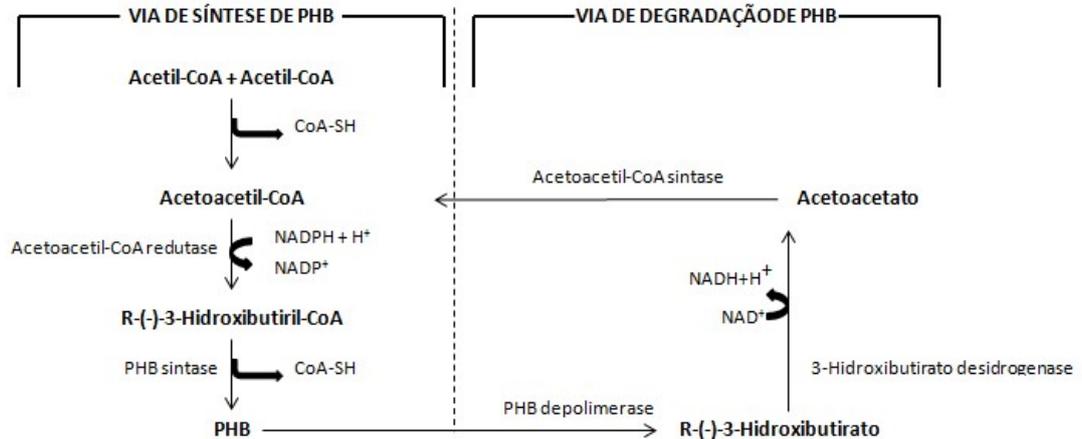


Legenda: Visão geral esquemática do metabolismo fotoautotrófico intermediário de *Synechocystis* PCC6803, com indicação de produtos energéticos e produção de PHA.

Fonte: Adaptado de WIJFFELS; KRUSE; HELLINGWERF, 2013 e CARPINE et al., 2015.

O estágio seguinte consiste na redução de acetoacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase, formando D-3-hidroxiacetil-CoA. Posteriormente, a enzima PHB sintase cataliza a incorporação das unidades monoméricas de R-3-hidroxiacetil-CoA, desenvolvendo, portanto, a cadeia do biopolímero. Como observado na Figura 9, além dos PHA o glicogênio também pode ser sintetizado, nessas condições, como forma de armazenamento de energia (SINGH et al., 2017; TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017; COSTA et al., 2018a).

Figura 10 – Vias de síntese e degradação do polihidroxiacetilato



Legenda: Via metabólica que envolve a síntese e degradação do poli-3-hidroxiacetilato (P3HB).

Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2017.

### 1.10 Outros fatores que influenciam a produção de polihidroxiacetilatos por cianobactérias

Como observado nas vias bioquímicas para produção de polihidroxiacetilatos, o fósforo é um componente de grande importância já que a razão ATP/NADPH pode influenciar no favorecimento de vias de síntese de PHA. Além de concentrações limitantes de nitrogênio, estudos também relatam a importância de se manter fósforo em baixas concentrações para o acúmulo de PHA. Como qualquer outro bioprocessos, a produção de PHA por cianobactérias é influenciada por parâmetros utilizados durante a produção de células e pela disponibilidade de

nutrientes. Dessa forma, para que a produção de biomassa celular em elevadas concentrações seja obtida é necessário que haja alta disponibilidade de nutrientes, fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, ferro e traços de micromoléculas, havendo, também, variabilidade das concentrações ideais desses componentes de acordo com a espécie de cianobactéria produzida (KAMRAVAMANESH; LACKNER; HERWIG, 2018).

Pode-se inferir, portanto, que há diferenças entre as condições ideais para produção de biomassa celular (com maior disponibilidade de nutrientes) e para o acúmulo de polihidroxialcanoatos (em concentrações limitantes de nitrogênio, por exemplo). Isso faz com que acúmulos favoráveis de PHA possam ser alcançados em baixas concentrações celulares por algumas espécies (KAMRAVAMANESH; LACKNER; HERWIG, 2018). Baseando-se nessa problemática, a estratégia mencionada a seguir foi pensada para o presente estudo. Foi mencionado previamente que a alimentação do nitrogênio amoniacal no bioprocesso por batelada alimentada favorece a biorremediação pela cianobactéria. Além disso, utilizar uma elevada concentração inicial de células também é favorável à biorremediação do nitrogênio amoniacal de meios amoniacais (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Dessa forma, uma das hipóteses do presente estudo é que quanto maior a concentração de células, maior a concentração de nitrogênio amoniacal poderá ser adicionada durante as alimentações por batelada alimentada para sua biorremediação e, ainda assim, obter uma concentração limitante em nitrogênio para a cianobactéria devido a elevada concentração de células a competir pela fonte de nitrogênio. Dessa forma, talvez seja possível aliar a biorremediação de elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal à produção de PHA. Haveria, portanto, duas fases. Uma de produção do inóculo concentrado necessário e outra de biorremediação do nitrogênio amoniacal simultânea à produção de PHA.

Como mencionado previamente, os custos relativos aos nutrientes requeridos para produção de polihidroxialcanoatos tem influenciado de forma significativa o custo final dos biopolímeros e a viabilidade do processo. Em relação à produção de polihidroxialcanoatos por cianobactérias, ressalta-se o fato de serem biomassas ricas em proteínas (cerca de 40% a 70%) em condições não limitantes de crescimento. Tal fato faz com que, após as fontes de carbono, as fontes nitrogenadas sejam as mais importantes nos meios de produção de cianobactérias, implicando em seu custo (DE CARVALHO et al., 2019).

Por isso há estudos quanto ao uso de efluentes como constituintes do meio de produção de cianobactérias já que as mesmas são capazes de utilizar fontes nitrogenadas disponíveis em efluentes. Essa possibilidade poderia aliar o desenvolvimento de um meio de produção de baixo custo à necessidade de remoção de fontes nitrogenadas de efluentes, de modo a atingir

concentrações mais baixas, dentro das faixas permitidas pela legislação ambiental para preservação dos corpos hídricos (SOLETTO et al., 2005; KOUTRA; GRAMMATIKOPOULOS; KORNAROS, 2017).

Outro parâmetro importante para a produção de células e acúmulo de PHA é a fonte de carbono utilizada. Por serem microrganismos fotossintetizantes, assimilam carbono na forma de CO<sub>2</sub>. Por serem mantidos em meios com pH na faixa de 6,5 a 10, dependendo da espécie de cianobactéria produzida, a forma carbônica dominante é bicarbonato, baseando-se nas reações de equilíbrio. Por conta disso, essa fonte inorgânica pode ser disponibilizada por aeração enriquecida com CO<sub>2</sub> ou pela adição de fontes de bicarbonato como bicarbonato de sódio e bicarbonato de amônio, por exemplo (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Cianobactérias são microrganismos autotróficos, no entanto, algumas espécies são capazes de crescer a partir de moléculas orgânicas por metabolismo heterotrófico ou mixotrófico (em que ocorre simultaneamente a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos externos). Diante disso, fontes orgânicas como acetato, citrato, glicerol, glicose, propionato, entre outros, têm sido avaliadas para a síntese de PHA. Singh e mallick (2017) listam diferentes estudos relativos à produção de PHA por cianobactérias, adicionando-se fontes orgânicas, aonde se observa o aumento do rendimento em biomassa e do acúmulo de PHA na biomassa (acúmulo de 38% de PHA por *Synechocystis sp.* PCC 6803, em adição de acetato e frutose, por exemplo).

Como foi previamente mencionado, a inserção de uma fonte orgânica de carbono no efluente tem aumentado a assimilação de nitrogênio amoniacal pelas cianobactérias envolvidas na biorremediação. Isso confere maior independência do aparato fotossintetizante das cianobactérias prejudicado pela toxicidade do nitrogênio amoniacal. Dessa forma, estimular a mixotrofia nas cianobactérias envolvidas no bioprocessamento pode potencializar tanto a biorremediação do nitrogênio amoniacal quanto a produção de PHA (LI et al., 2019c). Os polihidroxicarboxilatos são compostos de reserva energética e são acumulados pela cianobactéria em presença de abundância de carbono orgânico (PHALANISONG; PLANGKLANG; REUNGSANG, 2021). Dessa forma, no presente estudo, pensou-se na utilização do glicerol bruto residual, coproduto da produção de biodiesel, como uma forma de inserção de uma fonte orgânica de baixo custo no bioprocessamento. Além disso, há um aspecto positivo de conferir um destino ao glicerol bruto produzido através da cadeia produtiva do biodiesel.

### **1.10 O potencial do uso de resíduos como o glicerol bruto residual da produção de biodiesel e de efluentes da digestão anaeróbica para produção de cianobactérias e produção de PHA**

Como mencionado previamente, os custos relativos aos nutrientes necessários para produção de polihidroxicanoatos têm influenciado de forma significativa o custo final dos biopolímeros e a viabilidade do processo. Em relação à produção de polihidroxicanoatos por cianobactérias, ressalta-se o fato de serem biomassas ricas em proteínas, sendo encontrados percentuais proteicos na biomassa entre 40% e 70%. Tal fato faz com que, após as fontes de carbono, as fontes nitrogenadas sejam as mais importantes nos meios de produção de cianobactérias. Dessa forma, o custo das fontes nitrogenadas tem alta importância para o custo final do meio de produção das cianobactérias (CARVALHO *et al.*, 2019).

Uma alternativa para diminuir o custo com o meio de produção das cianobactérias consiste no uso de efluentes como fonte de nutrientes e constituintes do meio de produção, já que esses micro-organismos são capazes de utilizar fontes nitrogenadas disponíveis em efluentes. A Tabela 1.2 apresenta exemplos de nutrientes, necessários para o cultivo de cianobactérias, disponíveis em diferentes efluentes industriais. O uso dos efluentes para compor o meio de produção de cianobactérias poderia aliar o desenvolvimento de um meio de produção de baixo custo à necessidade de remoção de fontes nitrogenadas de efluentes, de modo a atingir concentrações mais baixas, dentro das faixas permitidas pela legislação ambiental para preservação dos corpos hídricos, já que diferentes tipos de efluentes municipais, agrícolas e industriais apresentam elevadas concentrações de fontes nitrogenadas. (SOLETTO *et al.*, 2005; KOUTRA *et al.*, 2017).

Nesse estudo, também pretende-se utilizar o glicerol bruto residual, coproduto da produção de biodiesel, propondo um destino e agregando valor à forma bruta desse coproduto. Pretende-se utilizar o glicerol bruto residual da produção de biodiesel como fonte de carbono orgânico para cianobactérias de modo a estimular a mixotrofia tanto para favorecer a biorremediação do nitrogênio amoniacal quanto para estimular as vias de síntese dos PHA (IBRAHIM; STEINBÜCHEL, 2009; LI *et al.*, 2019c; HEEPKAEW; SUWANNASILP, 2020).

O glicerol bruto residual é um coproduto da produção de sabão, ácidos graxos, biodiesel e óxido de propileno. Esse coproduto pode ser obtido após o processo de transesterificação durante a produção do biodiesel. Atualmente, a produção de biodiesel produz em torno de 10%

(m/m) de glicerol, o que significa que plantas produtoras de 100.000 toneladas, por ano, geram cerca de 10.000 toneladas de glicerol bruto residual (CORRÊA; TEIXEIRA, 2021).

Algumas características do glicerol bruto residual, do glicerol parcialmente refinado e do glicerol puro e comercial, após os processos de purificação da forma bruta, podem ser observadas na Tabela 1.3. Percebe-se que a concentração de glicerol é menor na forma bruta em comparação à concentração do glicerol comercial, o que restringe suas aplicações. O glicerol purificado pode ser utilizado na indústria química, farmacêutica, de alimentos e em diferentes tipos de bioprocessos (KUMAR et al., 2019; CHOZHAVENDHAN et al., 2020).

Tabela 1.2 – Exemplos de nutrientes presentes em diferentes efluentes tratados por digestão anaeróbica e seu potencial para compor meios de baixo custo para produção de microalgas e cianobactérias. O símbolo (-) indica que não foi encontrada a informação do parâmetro no estudo indicado.

Parâmetros	Lixiviado de aterro sanitário	Efluente da criação de suínos tratado por digestão anaeróbica	Efluente da criação de aves tratado por digestão anaeróbica	Efluente da criação de gado tratado por digestão anaeróbica	Vinhoto de cana-de-açúcar
Fonte	Caroline baettker et al. (2020)	Moretti; bertoncini; abreu-junior, (2021)	Locoli et al. (2019)	Locoli et al. (2019)	De godoi et al. (2019)
pH	8,2-8,4	7,8	7,55	8,06	4,9
DBO (mg.L <sup>-1</sup> )	2500±105	400,3	-	-	-
Nitrogênio amoniacal (mg.L <sup>-1</sup> )	2885±32	1590	508	181	118
Fósforo (mg.L <sup>-1</sup> )	26,9±5,6	49	52	40,8	140
Sulfato (mg.L <sup>-1</sup> )	Inferior a 100	-	234,4	212,4	2853
Cloreto (mg.L <sup>-1</sup> )	2600	-	-	-	2477
Ferro (mg.L <sup>-1</sup> )	40,9	2,2	-	-	10600

Zinco (mg.L <sup>-1</sup> )	0,97	1,2	-	-	0,82
Potássio (mg.L <sup>-1</sup> )	-	1096	-	-	2498

Origem dos efluentes: O lixiviado foi proveniente do aterro sanitário da região metropolitana de Curitiba cuja coleta foi realizada em maio de 2018. O efluente da criação de suínos tratado por digestão anaeróbica foi obtido no centro de pesquisa e desenvolvimento da secretaria de agricultura e abastecimento de São Paulo em 2016. O efluente da criação de aves tratado por digestão anaeróbica foi obtido em uma fazenda de produção de ovos em Bahía Blanca, Buenos Aires. O efluente da criação de gado tratado por digestão anaeróbica foi obtido através de produtores de gado da província de Villarino, Argentina. O vinhoto foi obtido em 2016 de uma indústria sucroalcooleira localizada em São Paulo.

Fonte: O autor, 2022.

No entanto, o glicerol bruto residual, por conter diferentes impurezas como sabão, metanol e alguns sais, não pode ser utilizado no setor alimentício ou farmacêutico e suas aplicações biotecnológicas também são limitadas. Os processos de purificação do glicerol bruto residual para atingir as características comerciais são custosos para plantas industriais de biodiesel de pequena e média escala. Diante disso, as aplicações limitadas do glicerol bruto residual e o elevado custo para sua purificação faz com que esse coproduto seja altamente disponível, havendo buscas por cadeias produtivas que possam aproveitar a forma bruta de modo a agregar valor a esse resíduo (KUMAR et al., 2019; CHOZHAVENDHAN et al., 2020).

Tabela 1.3 – Características do glicerol coproduto da produção de biodiesel na forma bruta, parcialmente refinada e do glicerol puro e comercial.

<b>Propriedades</b>	<b>Glicerol bruto residual</b>	<b>Glicerol parcialmente refinado</b>	<b>Glicerol puro e comercial</b>
Cor	Marrom escuro	Amarelo	Sem cor
pH	9,6	5	6,7
Densidade (kg/m <sup>3</sup> )	1,29	1,23	1,25
Carbono residual (%)	18	12	11,25
Cinzas (%)	11,26	0,14	Ausente
Percentual de glicerol (%)	10,43	42-44	95-99

Fonte: CHOZHAVENDHAN et al. 2020.

Dessa forma, o presente estudo é inovador ao propor o uso do glicerol bruto residual de biodiesel para biorremediação do nitrogênio amoniacal por cianobactérias propondo destino a

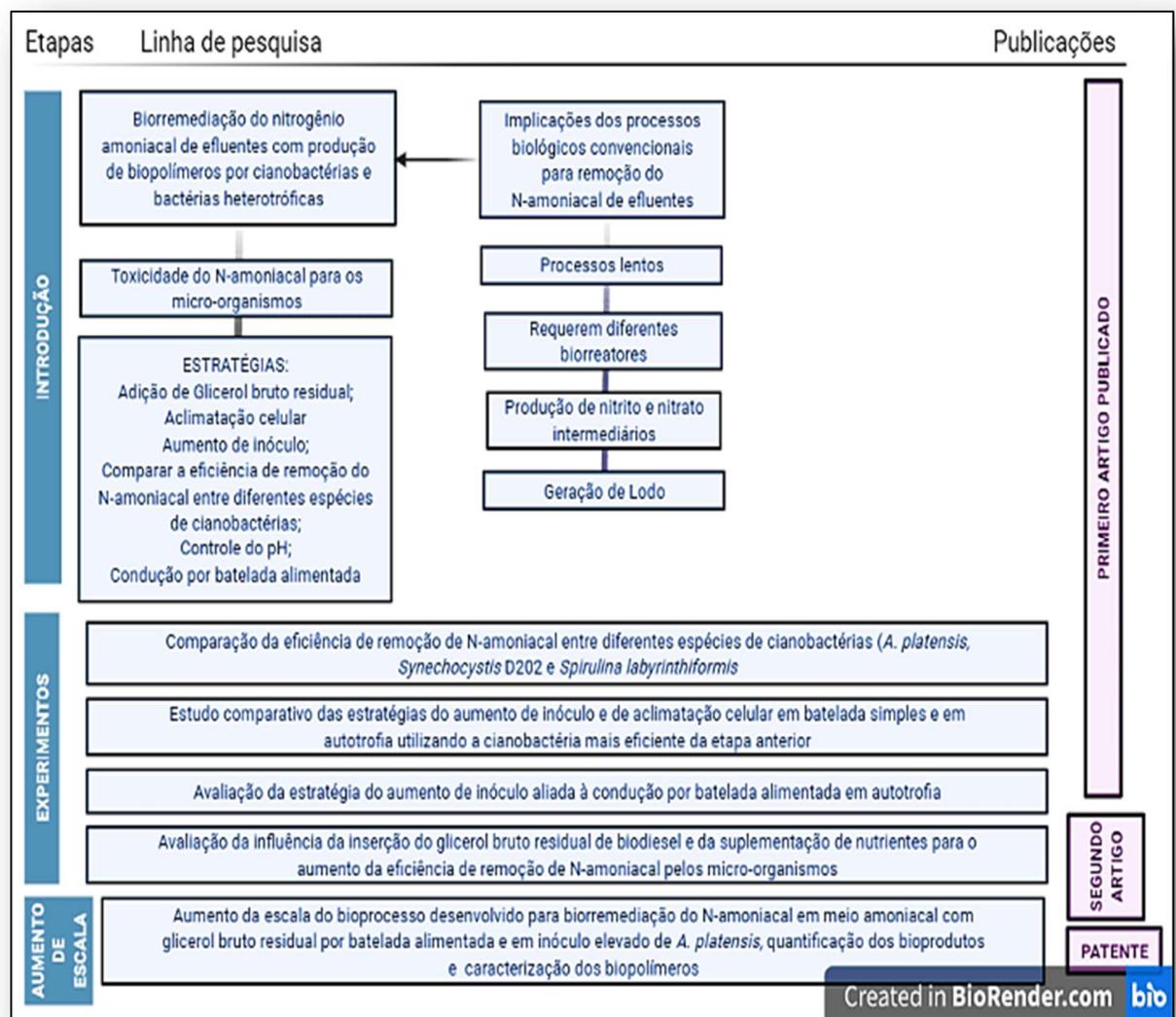
forma bruta desse coproduto. Um aspecto relevante é que Corrêa e Teixeira (2021) abordaram que a inserção do glicerol bruto residual em um cultivo de *A. platensis* proporcionou o crescimento simultâneo de bactérias heterófitas oriundas do inóculo não axênico da cianobactéria. Dessa forma, pretende-se investigar, no presente estudo, se essas bactérias também consomem nitrogênio amoniacal e produzem compostos de interesse industrial. Há, também, a hipótese de as bactérias heterotróficas também produzirem componentes ácidos capazes de diminuir o pH do meio e favorecer a prevalência de amônio em relação à amônia. Essa seria uma forma de baixo custo de controlar o pH do sistema e diminuir a toxicidade da amônia para os micro-organismos envolvidos na biorremediação do nitrogênio amoniacal. Além disso, também pretende-se investigar a influência da inserção do glicerol bruto residual da produção de biodiesel para o aumento da produção de PHA.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 ESTRUTURA DA PESQUISA

O fluxograma a seguir apresenta as fases do presente estudo assim como as respectivas publicações produzidas durante seu desenvolvimento.

Figura 11 – Esquema das etapas desenvolvidas no presente estudo



## 2.2 JUSTIFICATIVA

A sociedade tem vivenciado cada vez mais problemas de saúde atrelados à disponibilidade decrescente de recursos hídricos em condições de gerar água potável. Isso faz com que a garantia da qualidade dos corpos hídricos de modo a preservar a saúde da população seja o desafio do século para sociedade. Nesse contexto, países como o Brasil enfrentam desafio ainda maior, visto que apresentam uma produção agroindustrial elevada, sendo a produção de bovinos, aves, suínos, búfalos e de destilarias geradora de volumes elevados de efluentes ricos em nitrogênio amoniacal.

Além desses efluentes, há uma produção crescente de lixiviado, resultante da gestão de resíduos urbanos no mundo. Em comparação aos demais efluentes, o lixiviado apresenta a concentração mais elevada de nitrogênio amoniacal e a ausência de um processo eficiente e economicamente viável para remoção de nitrogênio amoniacal desses diversos efluentes pode levar à eutrofização de diferentes corpos hídricos e à mortandade dos organismos aquáticos presentes nos mesmos.

Os processos biológicos tradicionais para o tratamento de efluentes exigem elevada técnica, tempo e custo para o tratamento do efluente. Além disso, os micro-organismos produzidos durante o processo de biorremediação do nitrogênio amoniacal nos processos convencionais possuem baixa aplicabilidade biotecnológica. Devido ao potencial biotecnológico das cianobactérias e à rapidez de seu crescimento, é necessário estudar alternativas que garantam a viabilidade de um bioprocessos para biorremediação do nitrogênio amoniacal pelas mesmas, devido a urgência por um processo viável para tal finalidade.

As cianobactérias produzem carotenoides e ficocianina de elevado valor agregado, são ricas em proteínas, com potencial de uso como biofertilizante, e produzem biopolímeros biodegradáveis (polihidroxialcanoatos), precursores da produção de plásticos biodegradáveis, a partir de fontes inorgânicas de carbono. Nesse contexto, aliar a biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes à produção de polihidroxialcanoatos é importante devido aos impactos ambientais decorrentes da baixa biodegradabilidade dos plásticos compostos por polímeros petroquímicos.

No entanto, o nitrogênio amoniacal em elevadas concentrações é tóxico para as cianobactérias. Pretende-se, portanto, desenvolver um bioprocessos utilizando estratégias para diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para esses micro-organismos e para aumentar a concentração de nitrogênio amoniacal removida em alta eficiência de remoção. Pretende-se avaliar a estratégia de aumentar a concentração inicial de biomassa celular, de diminuir o pH

do sistema, de conduzir o bioprocesso por batelada alimentada e da inserção de uma fonte orgânica de carbono de baixo custo para indução à mixotrofia, já que estudos prévios relatam que tais estratégias têm aumentado a assimilação de nitrogênio amoniacal por cianobactérias.

De forma inovadora, pretende-se utilizar o glicerol bruto residual, coproduto da cadeia produtiva do biodiesel, para induzir a mixotrofia em cianobactérias e diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para as mesmas. De forma inovadora será desenvolvido um bioprocessos sinérgico entre as propostas de biorremediação de nitrogênio amoniacal de meios amoniacais e da produção concomitante de biopolímeros, proteínas e pigmentos de interesse industrial pelos micro-organismos envolvidos no bioprocessos. Outro aspecto positivo do presente estudo é propor uma aplicação ao glicerol bruto residual, como fonte de carbono orgânico para os micro-organismos envolvidos na biorremediação do nitrogênio amoniacal, e um destino aos diferentes efluentes industriais, ricos em nitrogênio amoniacal, como meios de baixo custo para produção de cianobactérias com diversas aplicações biotecnológicas.

### **2.3 HIPÓTESES DO PRESENTE ESTUDO**

- A sinergia entre as estratégias da redução do pH do meio, indução do metabolismo mixotrófico às cianobactérias, condução do bioprocessos por batelada alimentada e elevada concentração inicial de biomassa, em um único bioprocessos, implica em um aumento da eficiência da remoção do nitrogênio amoniacal pelas cianobactérias e bactérias heterotróficas envolvidas na biorremediação do nitrogênio amoniacal;
- O suprimento de nitrogênio amoniacal ofertado por batelada alimentada para as cianobactérias e bactérias heterotróficas cultivadas em um inóculo elevado e em mixotrofia pode favorecer o acúmulo de biopolímeros.
- As bactérias heterotróficas que crescem junto às cianobactérias mediante a presença da fonte orgânica produzem compostos acidificantes capazes de diminuir o pH do meio, favorecem a prevalência de amônio em relação à amônia e diminuem a toxicidade do nitrogênio amoniacal.

O fator motivador para avaliação da primeira hipótese consiste na ausência de estudos que avaliam as diferentes estratégias em sinergia e em um único bioprocesso para biorremediação do nitrogênio amoniacal de efluentes. A segunda hipótese é explicada pelo uso do inóculo elevado possibilitar a alimentação no bioprocesso de concentrações cada vez mais elevadas de nitrogênio amoniacal e ainda assim proporcionar uma concentração limitante em nitrogênio para as cianobactérias e para as bactérias heterotróficas envolvidas na biorremediação do nitrogênio amoniacal. Isso pode ser entendido pelo fato de haver muitas células competindo pela fonte nitrogenada.

A terceira hipótese seria justificada pela diversidade de componentes acidificantes produzidos por bactérias heterotróficas. Isso consistiria em uma alternativa de baixo custo para controlar o pH do sistema e para diminuir a prevalência de amônia em relação ao íon amônio e a sua toxicidade para os micro-organismos envolvidos na biorremediação do nitrogênio amoniacal.

## **2.4 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um bioprocesso para a assimilação de nitrogênio amoniacal e para produção concomitante de biopolímeros e pigmentos de interesse industrial por um cultivo misto de cianobactérias e bactérias heterotróficas em meios amoniacais contendo glicerol bruto residual.

## **2.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Dentre diferentes espécies de cianobactérias avaliadas quanto à eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal, produtividade em biomassa e produção de bioprodutos, selecionar a espécie mais promissora;
- ✓ Avaliar diferentes estratégias para aumentar a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal e a produção de compostos de interesse industrial pela cianobactéria em autotrofia em sinergia à estratégia de conduzir o bioprocesso por batelada alimentada;

- ✓ Avaliar a influência da inserção de glicerol bruto residual para produção de biopolímeros e para o aumento da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal pelos micro-organismos envolvidos no bioprocessos;
- ✓ Propor uma estratégia de baixo custo de controle do pH do sistema de modo a diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal para os micro-organismos envolvidos no bioprocessos;
- ✓ Desenvolver um bioprocessos para biorremediação do nitrogênio amoniacal de meios amoniacais contendo glicerol bruto residual e para produção de biopolímeros por cianobactérias e bactérias heterotróficas utilizando as melhores estratégias avaliadas;
- ✓ Avaliar o potencial biotecnológico das biomassas de cianobactérias e de bactérias heterotróficas produzidas durante o bioprocessos bem como a estratégia de separação dos diferentes bioprodutos produzidos;
- ✓ Caracterizar os biopolímeros (polihidroxialcanoatos) produzidos na condição que proporcionar o maior acúmulo de biopolímeros na biomassa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM) situado no Instituto Nacional de Tecnologia. As análises para caracterização dos polihidroxicanoatos foram realizadas através da colaboração com outros laboratórios, mencionados nos tópicos a seguir respectivos a cada análise.

#### 3.1 Manutenção das cianobactérias

A cianobactéria *Arthrospira platensis* é proveniente da coleção de microalgas e cianobactérias da professora Elizabeth Aidar, do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense (UFF). As cianobactérias *Spirulina labyrinthiformis* e *Synechocystis* D202 são originárias do Banco de Microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em meios líquidos, em tubos de ensaio, armazenadas em câmara de germinação Novatecnica NT 708 a 21°C, no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM) do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), onde os experimentos foram conduzidos.

Para manutenção da cepa de *Synechocystis* D202, utilizou-se o meio BG-11 (Tabela 3.1), desenvolvido por Stanier et al. (1971) com pH próximo a 7. O meio Zarrouk modificado por George (1976), em pH próximo a 9,2, foi utilizado para manutenção de *Spirulina labyrinthiformis* e *Arthrospira platensis*. Sua composição encontra-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 - Composição do meio BG-11

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Composição da solução de metais-traço</b>	
		<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	1,5		
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,04	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,075	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222
Ácido cítrico	0,006	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,39
Citrato de amônio e ferro III	0,006	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,079
EDTA	0,001	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0494
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02		
Solução de metais-traço	1 mL/litro		

Fonte: Stanier et al., 1971.

Tabela 3.2 – Composição do meio Zarrouk modificado por George (1976)

<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Composição da solução de microelementos</b>	
		<b>Composto</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
NaHCO <sub>3</sub>	13,61		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,03	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,000005
NaNO <sub>3</sub>	2,5	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,001
NaCl	1	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,001
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,002
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0,08	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0,8
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04		
Solução de microelementos	5 mL/L		

Fonte: George, 1976.

### 3.2 Comparação do cultivo de cianobactérias em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal

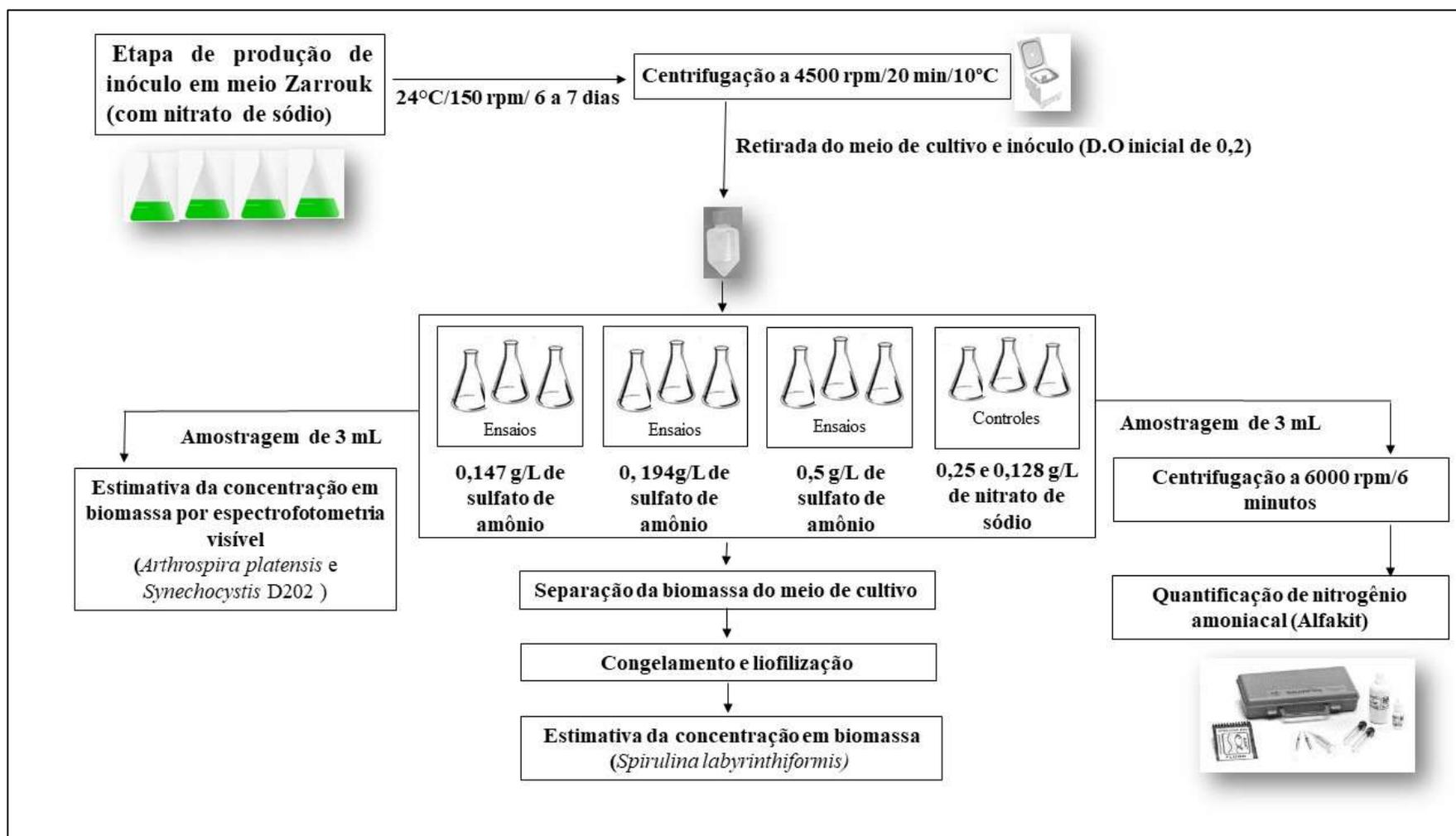
As condições de cultivo de *Arthrospira platensis*, *Spirulina labyrinthiformis* e *Synechocystis* D202 foram propostas por Costa et al. (2001) e Khazi, Demirel e Dalay, (2018). No presente estudo, o meio de crescimento padrão foi modificado substituindo a fonte de nitrogênio por uma fonte de nitrogênio amoniacal. Assim, no meio de Zarrouk modificado (George, 1976) o nitrato de sódio foi substituído por sulfato de amônio (padrão analítico, P.A., 99% de pureza, Isofar).

Foram utilizadas as seguintes concentrações de sulfato de amônio: 0,147; 0,194 e 0,5 (g.L<sup>-1</sup>). As soluções de sulfato de amônio adicionadas durante o preparo do meio foram esterilizadas por filtração a vácuo utilizando membranas de éster de celulose de 0,22 µm. Optou-se por esse método para evitar a evaporação de amônia por autoclavação. Foram realizados ensaios controle em meio Zarrouk modificado por George (1976) sem fontes de nitrogênio amoniacais e contendo nitrato de sódio. Buscou-se utilizar concentrações em nitrogênio dos ensaios controle próximas às utilizadas para as condições experimentais em fontes amoniacais.

Os cultivos para produção de inóculo, bem como para as avaliações, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume útil de 200 mL, em mesa agitadora (agitação a 150 rpm). A densidade de fluxo fotônico (DFF) ficou entre 260 e 372 fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>. A metodologia utilizada para a estimativa da densidade de fluxo fotônico foi descrita na seção de determinações analíticas. A temperatura média de 24°C foi utilizada em todos os cultivos.

O inóculo necessário para o experimento foi produzido em meio de Zarrouk modificado (George, 1976) com nitrato de sódio. Após o período de produção do inóculo, a cultura foi centrifugada a 4500 rpm por 20 min a 10°C para remover o meio nitrato de sódio utilizado para sua produção. A concentração inicial de biomassa dos ensaios foi próxima a 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Também foram realizados ensaios controle não inoculados, utilizando o mesmo meio de cultura dos experimentos. Esses ensaios foram conduzidos com o intuito de diferenciar a perda de amônia por evaporação da consumida pelas cianobactérias avaliadas. Um resumo dos experimentos está ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Resumo da metodologia utilizada para estimativa da produção de *Arthrospira platensis*, *Synechocystis* D202 e *Spirulina labyrinthiformis* em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal



No início e fim do experimento, foi realizada a quantificação do nitrogênio amoniacal (Seção 3.8.4). Para recuperação da biomassa de *A. platensis* e *Spirulina labyrinthiformis*, a cultura foi filtrada em tela de Nylon de 5  $\mu\text{m}$  (Tegape). Como o tamanho de *Synechocystis* D202 inviabiliza a filtração, a cultura desta cianobactéria foi centrifugada a 4500 rpm, por 20 minutos, a 4°C, para recuperação da biomassa. As biomassas recuperadas foram congeladas e liofilizadas (liofilizador modelo Enterprise II, marca Terroni). A biomassa liofilizada foi guardada em congelador para posteriores determinações.

Todas estas condições foram utilizadas para os cultivos posteriores, exceto quando indicado de outra forma. Foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração final em biomassa, produtividade volumétrica em biomassa (Qx), eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal NRE (%) e teor de carotenoides totais na biomassa. Foram feitas curvas de correlação (apresentadas na seção de determinações analíticas) para estimativa da concentração em biomassa das cianobactérias ao longo do cultivo.

### **3.3 Comparação de estratégias para melhor aproveitamento do nitrogênio amoniacal por *Arthrospira platensis*: aumento de inóculo e aclimatação celular**

As condições utilizadas para aclimatação das células foram baseadas em Tian et al. (2018) e Wang et al. (2018). A aclimatação foi realizada previamente à inoculação de *Arthrospira platensis* em meio de Zarrouk modificado pela substituição do nitrato de sódio por 0,6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio. De acordo com os resultados do presente estudo, a concentração de 0,6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio é tóxica para cianobactéria. Dessa forma, a aclimatação foi realizada para avaliar a possibilidade de aumento da eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal em concentração da fonte nitrogenada considerada tóxica.

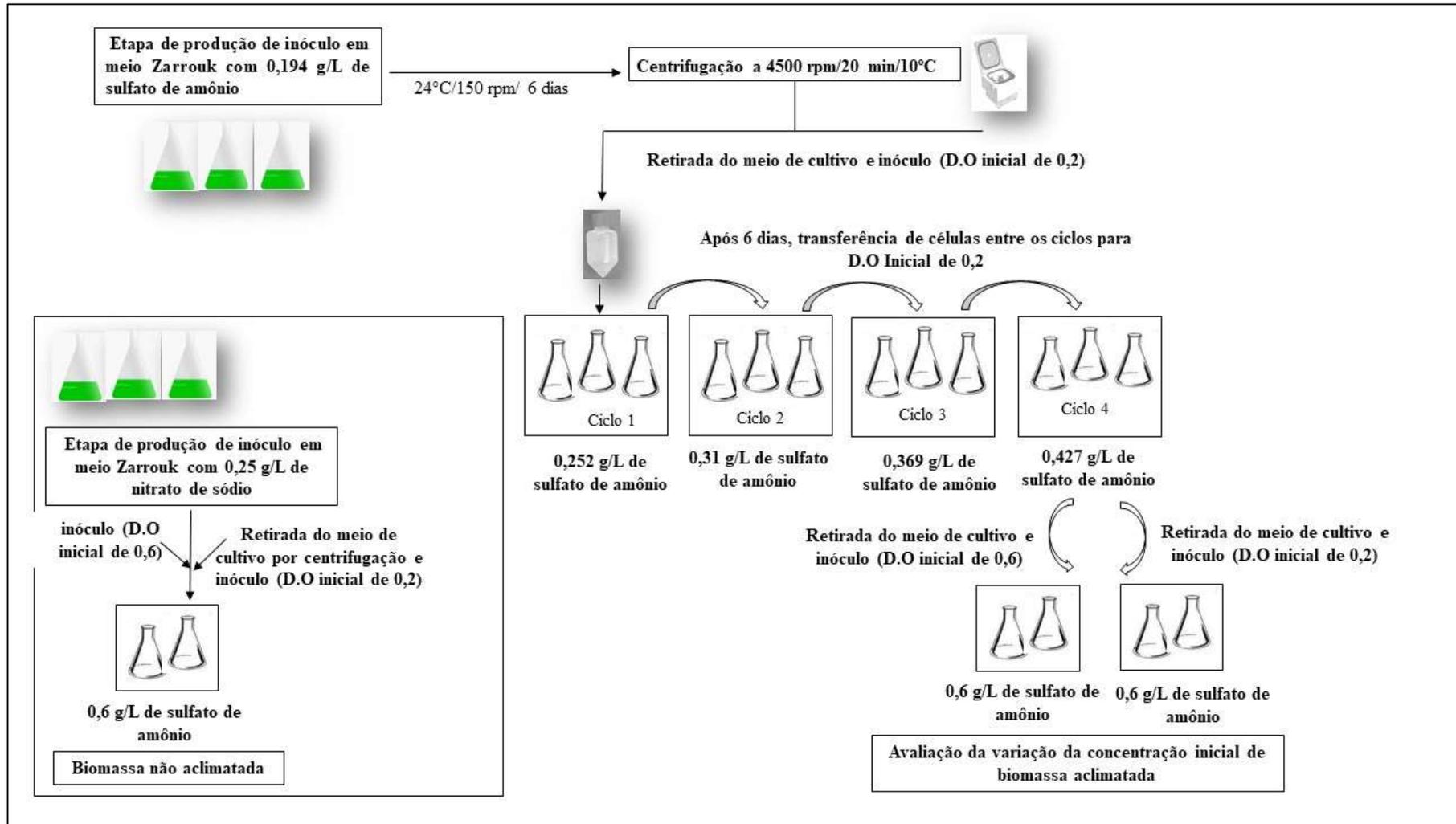
A aclimatação de *Arthrospira platensis* foi previamente realizada por meio de cultivos sucessivos com um aumento gradual da concentração de sulfato de amônio. Essa aclimatação foi realizada em cinco ciclos com as seguintes concentrações de sulfato de amônio: 0,194; 0,252; 0,31; 0,369; 0,427 g.L<sup>-1</sup>. Cada ciclo durou 6 dias. No último ciclo de aclimatação, as células foram transferidas para o meio de Zarrouk com a concentração inibitória de nitrogênio amoniacal (0,6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio).

Todos esses ensaios foram realizados com uma concentração inicial de biomassa próxima a  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Nessa concentração inibitória de sulfato de amônio, foram realizados ensaios de controle com *Arthrospira platensis* não aclimatada. Esses ensaios de controle foram realizados com inóculo produzido em meio de Zarrouk com nitrato de sódio ( $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ ).

Em seguida, avaliou-se a influência do aumento da concentração inicial de biomassa para o consumo de nitrogênio amoniacal pela cianobactéria. Foram realizados, portanto, cultivos com maior concentração inicial de biomassa. Neste experimento (em meio de Zarrouk com  $0,6 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio), em níveis tóxicos de nitrogênio amoniacal para cianobactéria, a concentração inicial de biomassa foi aumentada para  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Foram utilizadas culturas aclimatadas e não aclimatadas. Esses resultados foram comparados com os obtidos com uma concentração inicial de biomassa de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . O resumo desse experimento está descrito na Figura 13. Também foram realizados ensaios controle não inoculados, cujas condições foram descritas na seção 3.8.5, para avaliar a perda de amônia por evaporação utilizando o mesmo meio de cultura dos experimentos.

A concentração de nitrogênio amoniacal foi avaliada no início e no fim do cultivo. Os cultivos foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL, em um volume útil de 200 mL, com densidade de fluxo fotônico (D.F.F.) entre 260 e  $372 \text{ fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a 150 rpm, entre  $24^\circ\text{C}$ . Ao final do cultivo, foram determinadas a concentração em biomassa e a concentração em nitrogênio amoniacal; de posse destes resultados, foram calculadas a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal NRE (%) e a produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_x$ ).

Figura 13: Resumo da metodologia de aclimação de *Arthrospira platensis* em concentrações crescentes de N-amoniacal



Fonte: O autor, 2022.

### 3.4 Avaliação do efeito da condução do bioprocesso por batelada alimentada na assimilação do nitrogênio amoniacal por *A. platensis*

Para este experimento, as concentrações iniciais de biomassa adotadas foram baseadas nos dados experimentais deste estudo e nos de Sankaran e Premalatha (2018). As condições utilizadas para o experimento conduzido por batelada alimentada (pH do cultivo, concentração de nutrientes e de nitrogênio amoniacal nas alimentações por pulso) foram baseadas nos estudos de Soletto et al. (2005), Markou (2015) e Li et al. (2019).

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com volume inicial de 200 mL, com inóculo de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em meio de Zarrouk modificado (pH inicial de 8,5, ajustado com HCl 1M) em triplicata, substituindo o nitrato de sódio por 0,3 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (aproximadamente 50 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub>). Após o consumo desta fonte de nitrogênio pela cianobactéria, e quando foram atingidas concentrações abaixo de 20 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub> (limite permitido pela legislação brasileira), a alimentação por pulso foi realizada nos experimentos com uma solução de sulfato de amônio, visando restabelecer a concentração inicial de nitrogênio amoniacal (em torno de 58±6 mg.L<sup>-1</sup>). Três alimentações por pulso (F1, F2 e F3) foram realizadas nas duas condições analisadas (com inóculo de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>).

O meio de Zarrouk modificado (20 mL) foi usado como solução de alimentação (FS1, FS2 e FS3), substituindo o nitrato de sódio por sulfato de amônio e acidificado com HCl 1M para atingir o pH desejado: FS1 (pH 6,8), FS2 (pH 6,0) e FS3 (pH 4,0). No décimo primeiro dia, próximo ao final do experimento (13 d), e quando as células atingiram a fase estacionária, o pH das culturas foi ajustado para 8,5 visando distinguir os resultados de crescimento mediante a inibição pela amônia em pH alcalino e mediante ao não crescimento por limitação nutricional da cianobactéria.

O inóculo necessário para o experimento foi produzido em meio de Zarrouk modificado (biomassa não aclimatada). Ao final da produção do inóculo, as suspensões celulares foram filtradas em tela de nylon de 5 µm para recuperação de biomassa. Após a lavagem da biomassa com água destilada autoclavada para remoção do nitrato de sódio, em condições assépticas, o inóculo foi utilizado nos experimentos. Experimentos controle foram realizados em meio de Zarrouk modificado com nitrato de sódio. Nesses ensaios controle, utilizou-se a concentração de 0,386 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio equivalente em nitrogênio a 0,3 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio.

Os experimentos foram realizados em agitador rotativo com agitação a 150 rpm. A densidade de fluxo fotônico (PFD) ficou entre 250 e 389 fótons  $m^{-2}s^{-1}$  e a temperatura média foi de 24°C. Também foram realizados ensaios controle não inoculados, utilizando o mesmo meio de cultura dos experimentos.

A concentração final de biomassa e a produtividade volumétrica de biomassa ( $Q_x$ ) foram determinadas. A concentração de nitrogênio amoniacal também foi avaliada diariamente para calcular a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, NRE (%), e a eficiência de conversão de nitrogênio amoniacal em biomassa de *Arthrospira platensis*, CE (%). Ao final do experimento, avaliou-se o teor de pigmentos de interesse industrial como carotenóides totais e ficobiliproteínas.

### **3.5 Avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial**

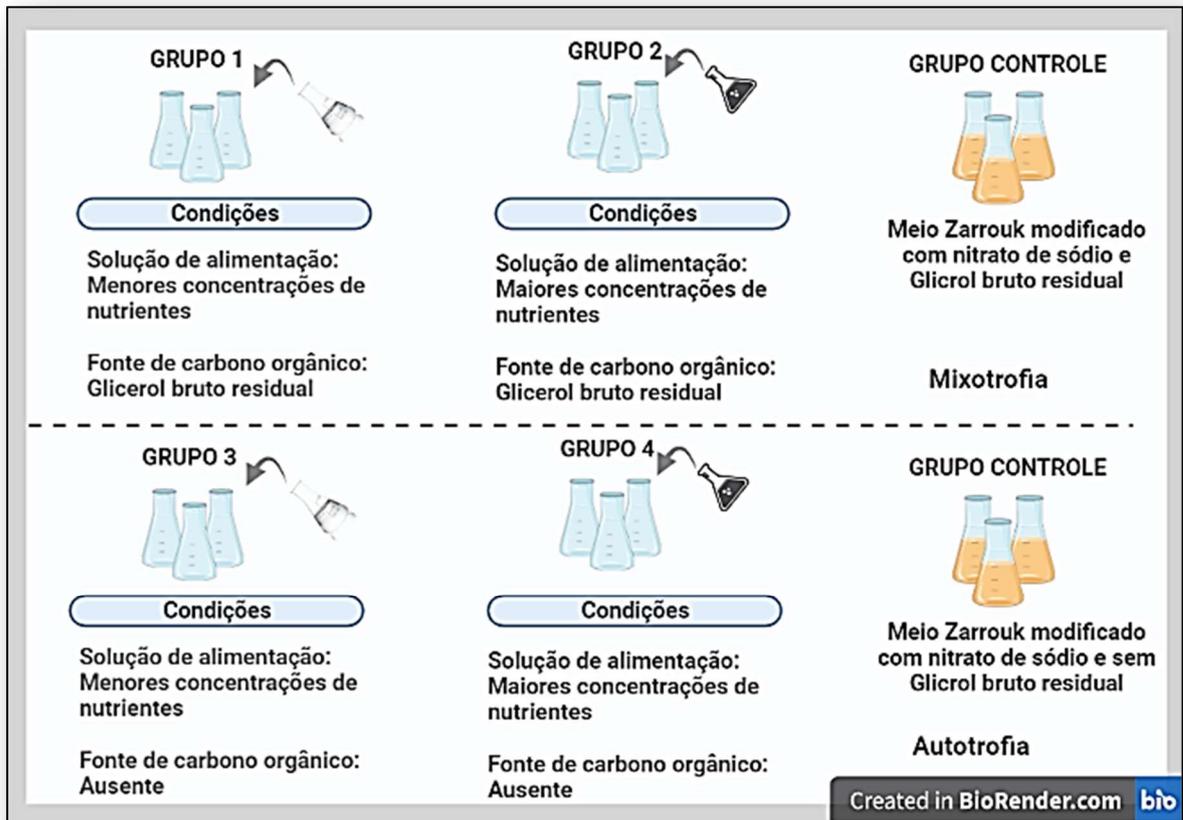
As condições utilizadas para o desenvolvimento deste bioprocessamento foram baseadas nos estudos citados a seguir. A concentração do inóculo foi baseada em Sankaran e Premalatha (2018) e nos resultados do presente estudo. Os parâmetros utilizados para batelada alimentada foram baseados em Li et al. (2019). As condições de cultivo mixotrófico de *A. platensis* em glicerol bruto residual foram baseadas em Corrêa e Teixeira (2021).

Quatro condições experimentais, detalhadas a seguir, foram comparadas (Figura 14). Condição 1: presença de glicerol bruto residual e solução de alimentação por pulso com menores concentrações de nutrientes; condição 2: presença de glicerol bruto residual e solução de alimentação por pulso com maiores concentrações de nutrientes; condição 3: ausência de glicerol bruto residual e solução de alimentação por pulso com menores concentrações de nutrientes e condição 4: ausência de glicerol bruto residual e solução de alimentação por pulso com maiores concentrações de nutrientes.

Inicialmente, o inóculo necessário para os experimentos foi produzido em meio de Zarrouk modificado. O inóculo foi produzido em frascos Erlenmeyer, com 200 mL de volume útil, com concentração inicial de biomassa próxima a 0,1  $g.L^{-1}$  e nas mesmas condições experimentais mencionadas a seguir. A biomassa produzida após 7 dias foi recuperada por

filtração (tela de nylon de 5  $\mu\text{m}$ ), sob condições assépticas, lavada com água destilada autoclavada para remoção do nitrato de sódio e inoculada nos experimentos.

Figura 14- Esquema dos experimentos realizados para avaliar a influência da inserção do glicerol bruto residual e da concentração de nutrientes para assimilação do nitrogênio amoniacal por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer (volume útil inicial de 150 mL) nas seguintes condições: mesa agitadora com agitação a 150 rpm; densidade de fluxo fotônico (PFD) a  $319 \pm 90$  fótons  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; temperatura média de  $24^\circ\text{C}$  e concentração inicial de biomassa de  $1,43 \pm 0,04$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 15). O experimento foi realizado em meio de Zarrouk modificado (pH inicial de 8,5 ajustado com HCl 1M).

O nitrato de sódio foi substituído por  $0,3$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sulfato de amônio (padrão analítico P.A, 99% de pureza da Isofar) o que gera aproximadamente  $50$   $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ . Após o consumo de nitrogênio amoniacal pela cianobactéria, a alimentação foi realizada nos experimentos com

as soluções de alimentação (pH 4,0), contendo o nitrogênio amoniacal e demais nutrientes, visando restabelecer a concentração inicial de nitrogênio amoniacal (entre 40 e 50 mg.L<sup>-1</sup>).

Figura 15 – Disposição dos experimentos na mesa agitadora com iluminação e reunião da biomassa utilizada como inóculo.



Legenda: Foi feito um rodízio aleatório entre as posições na mesa agitadora para alcançar as densidades de fluxo fotônico desejadas. Foto realizada no início do experimento com concentração inicial de biomassa em torno de 1 g.L<sup>-1</sup>

Fonte: O autor, 2022.

Os experimentos foram alimentados com 25 mL da solução de alimentação. As composições das soluções de alimentação foram baseadas na composição do meio de Zarrouk modificado. A solução de alimentação utilizada para ensaios com menor suplementação de nutrientes teve a seguinte composição: NaHCO<sub>3</sub>, 10 g.L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,39 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup>; NaCl, 1 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, 0,08 g.L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,04 g.L<sup>-1</sup> e uma solução de metal traço, 5 mL.L<sup>-1</sup>. A composição da solução de metal traço foi a seguinte (g.L<sup>-1</sup>): ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,000005; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,01; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,001; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,001, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,002, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,7 e Na<sub>2</sub>EDTA<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 0,8.

A solução de alimentação utilizada nos experimentos com maior suplementação de nutrientes foi 3x mais concentrada que a solução anterior, com exceção do bicarbonato de sódio, que foi mantido a  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . As soluções de alimentação foram acidificadas com HCl 1M para atingir o pH desejado de 4,0. O total de quatro alimentações de glicerol bruto residual foram realizadas nos experimentos (a cada dois dias). Nas duas primeiras alimentações foram adicionados  $12 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol bruto residual e nas demais alimentações  $6 \text{ g.L}^{-1}$ .

Os seguintes parâmetros foram avaliados diariamente: a concentração de nitrogênio amoniacal ( $\text{mg.L}^{-1}$ ); eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, NRE (%); pH e concentração de biomassa, através de dados de densidade óptica obtidos por análise de espectrofotometria do visível (730 nm). Ao final do experimento (após 10 d) a biomassa foi recuperada por centrifugação a 5000 rpm por 20 min (Excelsa II, FANEM). As biomassas recuperadas foram congeladas e liofilizadas (liofilizador Terroni modelo Enterprise II) para as análises subsequentes. Os produtos de interesse industrial produzidos pela biomassa foram quantificados na biomassa liofilizada: polihidroxicanoatos ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), ficocianina ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), carotenóides totais ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) e proteínas (%).

Os experimentos controle foram realizados em meio de Zarrouk modificado com nitrato de sódio ( $0,386 \text{ g.L}^{-1}$ ), equivalente em nitrogênio a  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio, concentração utilizada no início dos experimentos. O controle da perda de amônia nos experimentos por evaporação foi avaliado de acordo com Álvarez e Otero (2020) através de ensaios não inoculados.

### **3.6 Avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual: experimentos em garrafas de 5 L**

As condições utilizadas nesta fase do estudo foram baseadas em Dos santos et al. (2019) e Corrêa e Teixeira (2021). Os experimentos, realizados em triplicata, bem como as culturas utilizadas para a produção do inóculo, foram realizados em frascos plásticos transparentes (tereftalato de polietileno) com volume de 5 L e volume útil inicial de 1 L. O inóculo foi produzido em meio de Zarrouk modificado, com concentração inicial de biomassa próxima a

0,1 g.L<sup>-1</sup>, nas mesmas condições experimentais mencionadas a seguir. A recuperação da biomassa e sua transferência para os experimentos foi semelhante ao experimento anterior.

As culturas foram mantidas a uma temperatura média de 24°C e sob constante aeração com ar atmosférico filtrado, fornecido por um compressor de ar. Os experimentos foram mantidos sob iluminação constante com densidade de fluxo fotônico (DFF) a 319±90 fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (dosímetro: Biospherical Instrument, QSL 2100) por lâmpadas Plafon LED brancas (20cmx20 cm/18V). A medição da densidade de fluxo fotônico encontra-se na seção de determinações analíticas. A concentração inicial de biomassa utilizada foi de 1,55±0,04 g.L<sup>-1</sup> (Figura 16).

O meio de Zarrouk modificado (pH inicial de 8,5 ajustado com HCl 1M) sem nitrato de sódio e com sulfato de amônio foi usado neste experimento. A concentração inicial de nitrogênio amoniacal foi em torno de 50 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub>. Após o consumo total de nitrogênio amoniacal, foi realizada a alimentação nas culturas com a solução de alimentação (pH 4,0), visando restabelecer a concentração de nitrogênio amoniacal para valores em torno de 50 mg.L<sup>-1</sup>, nas primeiras quatro alimentações, e 100 mg.L<sup>-1</sup>, nas três últimas alimentações. As alimentações foram realizadas diariamente com 100 mL da solução com a menor concentração de nutrientes do experimento anterior. Foram realizadas três alimentações, a cada dois dias, com 6 g.L<sup>-1</sup> de glicerol bruto residual nas culturas.

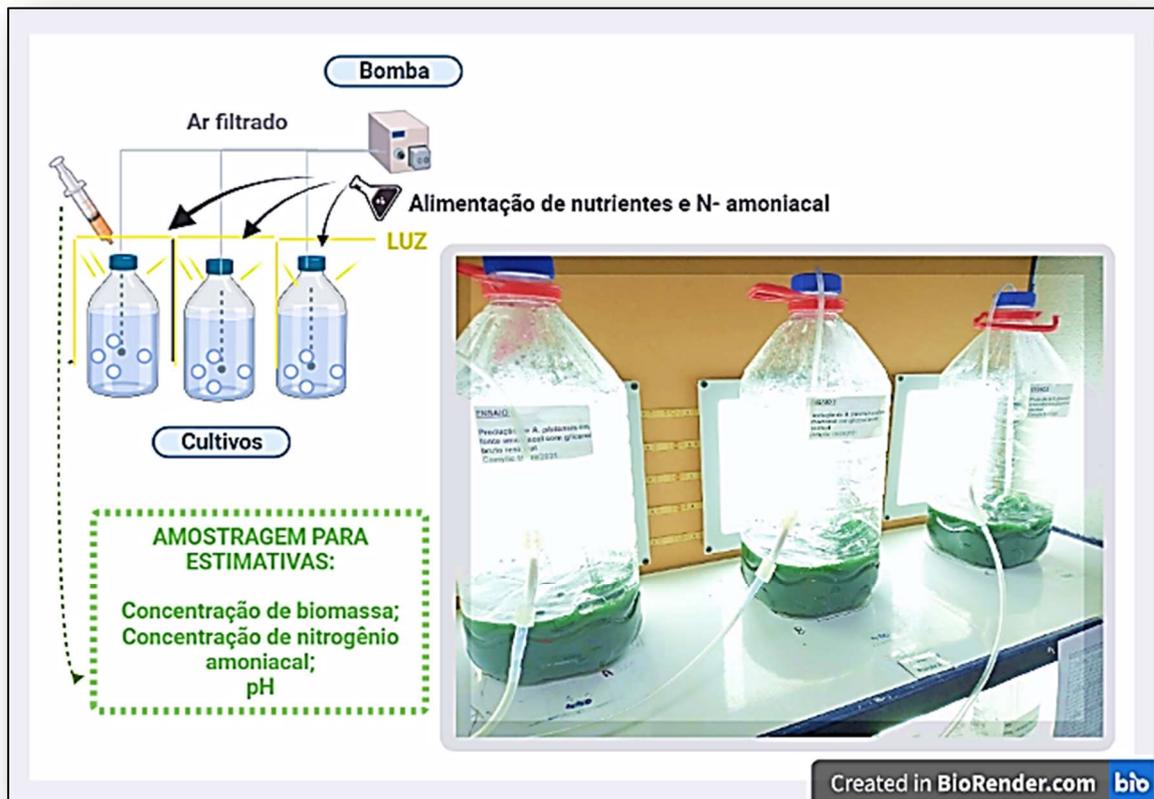
Ao final do experimento (8 d), 65% do volume da cultura foi filtrado (em tela de nylon de 5 µm) para reter apenas as cianobactérias e avaliar os compostos de interesse industrial produzidos pelas mesmas. Os 35% restantes da cultura foram centrifugados a 5000 rpm por 20 min para recuperar, além da cianobactéria, as bactérias heterotróficas produzidas e avaliar sua influência para o aumento da produção de compostos de interesse industrial.

Os seguintes parâmetros foram avaliados diariamente: a concentração de nitrogênio amoniacal, (mg.L<sup>-1</sup>); eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, NRE (%); pH e a concentração de biomassa através de análise de peso seco, (g.L<sup>-1</sup>). As quantificações de nitrito, nitrato e glicerol no meio foram realizadas no início e ao final do experimento. Ao final do experimento (após 8 d), a biomassa foi recuperada por filtração ou centrifugação, congelada e liofilizada (liofilizador Terroni modelo Enterprise II) para as análises subsequentes.

Os seguintes compostos de interesse industrial produzidos pela biomassa foram quantificados na biomassa liofilizada recuperada por filtração ou centrifugação: polihidroxialcanoatos (mg.g<sup>-1</sup>), ficocianina (mg.g<sup>-1</sup>), carotenóides totais (mg.g<sup>-1</sup>) e percentual em proteínas totais na biomassa (%). O consumo total de nitrogênio amoniacal pela biomassa

produzida foi calculado a partir da análise da porcentagem de nitrogênio na biomassa liofilizada (composta por *A. platensis* e bactérias heterotróficas) pela análise C:H:N.

Figura 16 – Esquema dos experimentos em garrafões com volume útil inicial de 1L



Legenda: Disposição dos garrafões na estante iluminada por Plafons em LED branco para alcançar as densidades de fluxo fotônico desejadas. Os garrafões foram agitados por aeração com ar filtrado suprido através de um compressor de ar. Fotos realizadas no início do experimento.

Fonte: O autor, 2022.

Foi realizado um experimento controle para analisar a produção de PHA por *A. platensis* em autotrofia e com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. O experimento também foi realizado em garrafas aeradas, em meio Zarrouk modificado por George, nas mesmas condições previamente mencionada e em duplicata. Utilizou-se a densidade de fluxo fotônico de  $395 \text{ f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . O experimento foi conduzido por batelada sequencial de modo a induzir a síntese de PHA para cianobactéria. Houve o cultivo da cianobactéria por 14 dias em meio Zarrouk contendo nitrato de sódio ( $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) e com concentração inicial de biomassa próxima a  $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . No décimo quarto dia e em condições assépticas toda biomassa foi transferida para o meio Zarrouk sem nitrato de sódio de modo a induzir a síntese dos PHA pela cianobactéria. Esse

experimento foi comparado aos experimentos em meio amoniacal contendo glicerol bruto residual de modo a avaliar a influência da inserção da fonte orgânica e do cultivo misto para o acúmulo de PHA.

### **3.7 Caracterização dos polihidroxicanoatos**

#### **3.7.1 Difractometria de Raios-X (DRX)**

A análise foi realizada no Laboratório de Difração de Raios X, situado no Instituto Militar de Engenharia (IME-RJ). Utilizou-se a técnica de difratometria de Raios-X visando obter informações acerca do grau de cristalinidade do biopolímero produzido. O difratômetro de raios X (X'Pert PRO MRD da PANalytical) foi utilizado para análise. O equipamento foi operado a 40 kV, 40 Ma, utilizando um filtro de Fe. Utilizou-se uma escala  $2\theta$  entre  $5^\circ$  e  $60^\circ$  para obtenção dos dados.

#### **3.7.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais LMCM do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - COPPE - POLI – UFRJ. Realizou-se a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e refletância atenuada – FTIR-ATR para determinação da composição química dos biopolímeros produzidos durante o bioprocessamento. Para isto, utilizou-se o equipamento Spectrum 100 – Peking-Elmer. O espectro foi obtido na faixa de comprimento de onda entre  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  com 32 corridas por amostra.

#### **3.7.3 Calorimetria exploratória de varredura – DSC.**

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais LMCM do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - COPPE - POLI – UFRJ. As transições térmicas características do polímero produzido foram caracterizadas por DSC. Para análise foi utilizado o equipamento Hitachi -DSC 7020 Analysis System. Realizou-se dois ciclos de aquecimento e um de resfriamento usando 10 mg de amostra, aproximadamente, em vazão de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio e usando fluxo de 50 mL/min. O primeiro ciclo de aquecimento foi realizado em uma faixa de temperatura compreendida desde -20 até 200 °C, seguido de uma isoterma de 200 °C por 1 min. Em seguida, houve resfriamento até -80 °C, seguido de um aquecimento até 200 °C (AGUIAR et al., 2021).

#### **3.7.4 Analise Termogravimétrica – TGA**

A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais LMCM do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - COPPE - POLI – UFRJ. A estabilidade térmica e a perda de massa da amostra polimérica sintetizada foram avaliadas por análise termogravimétrica usando um equipamento Shimadzu TGA-50 com faixa de aquecimento de 40°C a 700°C e taxa de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de N<sub>2</sub>.

#### **3.7.5 Cromatografia de permeação em gel – GPC**

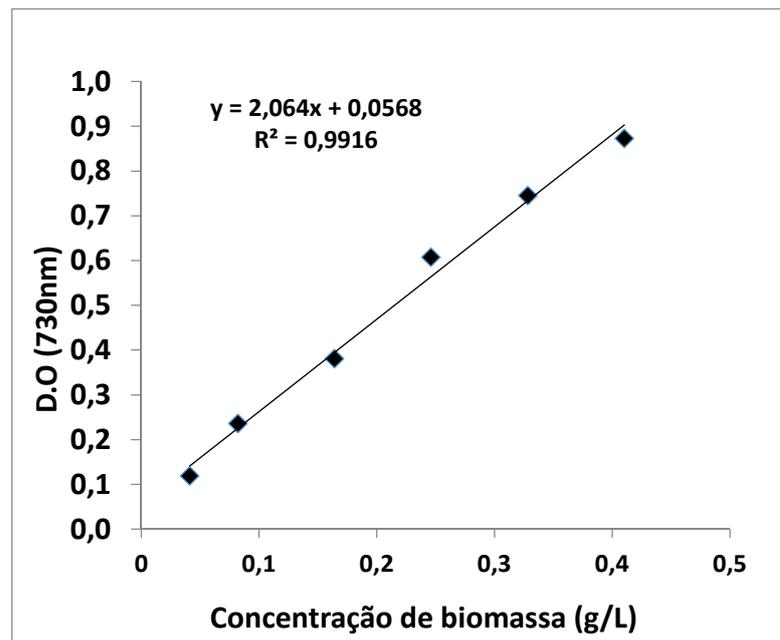
A análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais LMCM do departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais - COPPE - POLI – UFRJ. Para avaliação da massa molar ponderal, da massa molar numérica e da polidispersão das cadeias do polímero, foi realizada a Cromatografia de permeação em gel – GPC utilizando-se o equipamento Shimadzu LC Solution e 6 mg do material extraído, aproximadamente.

### **3.8 Determinações analíticas**

### 3.8.1 Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi determinada utilizando uma relação linear entre os dados de densidade óptica (DO), obtidos por análise espectrofotométrica, e os da análise de massa seca, conforme visto nos Gráficos 1 e 2 para *Synechocystis* D202 e *Arthrospira platensis* respectivamente. Para obter as equações dos gráficos, inicialmente foi realizada a quantificação da biomassa por massa seca para cada espécie. Posteriormente, diluições desta suspensão celular foram feitas em água destilada e então analisadas utilizando o espectrofotômetro Spectrum Modelo SP-1105 para obter a faixa de densidade óptica em 730 nm. Os gráficos foram elaborados pela relação entre os valores de densidade óptica e os resultados de massa seca.

Gráfico 1 - Correlação entre os dados obtidos pelas análises por espectrofotometria visível e por massa seca da cianobactéria *Synechocystis* D202



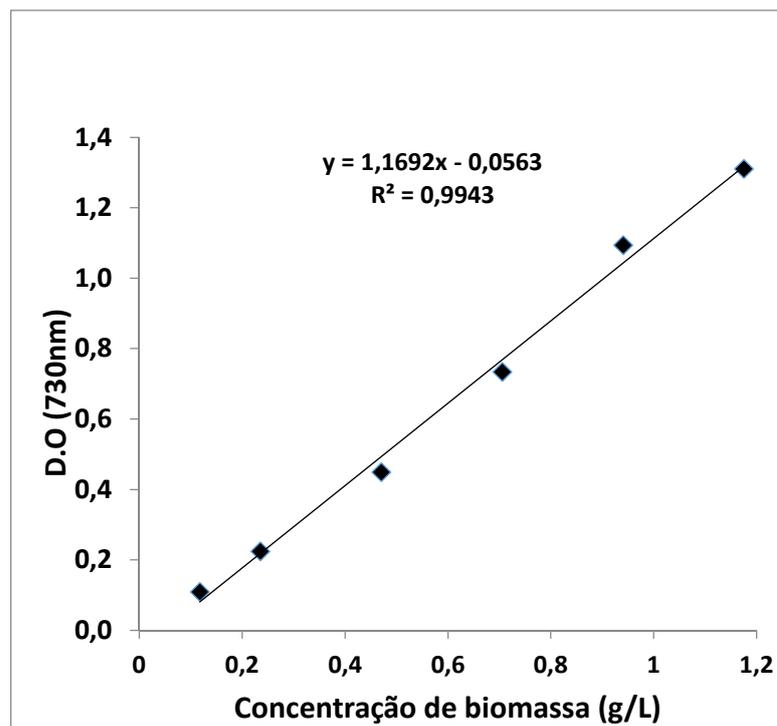
Fonte: O autor, 2022.

Para determinar a massa seca, 20 mL e 10 mL da suspensão celular de *Arthrospira platensis* e *Synechocystis* D202, respectivamente, foram filtrados através de membranas de fibra de vidro de 0,7-1,2  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel) com uma etapa de lavagem. As membranas foram então secas a  $105^\circ\text{C}$  em uma balança Ohaus, modelo MB45. A massa seca foi então determinada por gravimetria.

Como a *Spirulina labyrinthiformis* produz aglomerados celulares, não foi possível retirar alíquotas com a mesma concentração. Assim, a determinação da concentração de biomassa foi realizada pesando a biomassa liofilizada a partir de suspensões celulares com mesmo volume, em triplicata. A produtividade volumétrica de biomassa,  $Q_x$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), foi então determinada de acordo com a Eq. (1), onde  $t$  representa o tempo de cultivo (d);  $X_f$  é a concentração final de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ), e  $X_i$  é a concentração inicial de biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$$Q_x (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}) = X_f - X_i t \quad (1)$$

Gráfico 2 - Correlação entre os dados obtidos pelas análises por espectrofotometria visível e por massa seca da cianobactéria *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

### 3.8.2 Determinação da concentração de ficocianina

A determinação da concentração de ficocianina foi realizada com base em Lima et al. (2018). Para análise, adicionou-se 10 mL de tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,48, em 0,01 g

de biomassa liofilizada, recuperada por filtração ou centrifugação. A mistura foi levada ao vórtex por 30 segundos e mantida a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Posteriormente, as amostras foram descongeladas. Os extratos foram separados da biomassa por centrifugação a 4500 rpm, por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi retirado e sua absorvância medida em um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific).

No pellet contendo a biomassa remanescente, 10 mL de PBS foram adicionados para realizar um segundo ciclo de congelamento-descongelamento. A mistura foi mantida a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Depois disso, as amostras foram descongeladas. Os extratos foram então obtidos seguindo os mesmos procedimentos mencionados previamente.

Todos esses procedimentos foram realizados ao abrigo da luz. Os seguintes parâmetros: concentração de ficocianina no extrato (C-PCe;  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); na biomassa (C-PC;  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e a produtividade de ficocianina (C-PCp;  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) foram obtidas através das equações 2, 3 e 4, respectivamente, com base em Bennett e Bogorad (1973).

$$C - PCe = (A_{615} - 0.474 * A_{652})/5.34 \quad (2)$$

$$C - PC = (C - PCe * V)/m \quad (3)$$

$$C - PCp = (C - PC * X)/t \quad (4)$$

A soma dos valores de concentração da ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), obtidos no primeiro e no segundo ciclos de extração, foi calculada para considerar a concentração total de ficocianina na biomassa.  $A_{615}$  e  $A_{652}$  são absorvâncias em 615 e 652 nm, respectivamente;  $V$  é o volume usado na extração (mL);  $X$  é a concentração final de biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de cultivo (d).

### 3.8.3 Determinação da concentração de carotenoides totais

A metodologia utilizada para quantificar os carotenoides totais foi baseada em Dos santos et al. (2019) com pequenas modificações. Primeiramente, 6 mL de acetona foram adicionados a 0,2 g de biomassa liofilizada recuperada por liofilização ou centrifugação.

Posteriormente, a mistura foi agitada em vórtex por 30 s e o ensaio foi sonificado por 5 min usando um banho de ultrassom (marca única 1800 USC-3,8L). Em seguida, o ensaio foi mantido a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 2 h.

O primeiro extrato foi então obtido por centrifugação a 4500 rpm por 20 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$ . O extrato (sobrenadante) foi lido em um espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys 10S UV-Vis. Posteriormente, os pigmentos restantes no pellet foram extraídos. Essa etapa foi realizada pela adição de acetona (6 mL) ao pellet para obtenção do segundo extrato após homogeneização e centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O terceiro extrato foi obtido seguindo o mesmo princípio citado anteriormente. Todas as etapas para a extração dos pigmentos foram realizadas em local escuro para evitar sua possível foto-oxidação. As seguintes equações foram usadas para obter a concentração de carotenóides totais de acordo com Lightenthaler (1987): Eq. (5), (6) e (7).

$$\text{Chl}_a = 10.81 * A_{661.6} \quad (5)$$

$$\text{Car}_e = (1000 * A_{470} - 1.9 * \text{Chl}_a) / 214 \quad (6)$$

$$\text{Car}_T = \sum \text{Car}_e * V / m \quad (7)$$

Onde a  $\text{Chl}_a$  é a concentração de clorofila-a no extrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ),  $\text{Car}_e$  é a concentração dos carotenóides totais no extrato ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), e  $\text{Car}_T$  é a concentração de carotenóides na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ).  $A_{661.6}$  e  $A_{470}$  são as absorvâncias em 661,6 e 470 nm, respectivamente.  $V$  é o volume de solvente utilizado na extração (L), e  $m$  é a massa usada para a extração (g).

### 3.8.4 Determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato

Para analisar a concentração de nitrogênio amoniacal presente no meio foi utilizado o kit Spectro Ammonia Indotest (Cod.2542), Alfakit, baseado no método do azul de indofenol. Inicialmente, foram realizadas análises de diferentes diluições de uma solução padrão de amônia com o kit para fazer uma curva de correlação entre as absorvâncias, obtidas pela análise espectrofotométrica, e a concentração de nitrogênio amoniacal. O padrão utilizado para preparar as diluições e elaborar a curva foi o seguinte: cloreto de amônio (pureza acima de 99%) com  $100 \pm 0,06 \text{ mg/L}$  de  $\text{NH}_3$  – Alfakit. As leituras foram obtidas a 630 nm (espectrofotômetro

Thermo Scientific™ Genesys 10S UV-Vis). A Eq. (8) descreve a curva de correlação, onde N-NH<sub>3</sub> é a concentração de nitrogênio amoniacal em mg.L<sup>-1</sup> e A<sub>630</sub> é a absorvância em 630 nm.

$$N-NH_3=(A_{630}-0.0889)/0.6472 (R^2=0.9957) \quad (8)$$

Posteriormente, a concentração do nitrogênio amoniacal presente na cultura foi quantificada realizando, previamente a centrifugação de alíquotas de 2 mL de cultura, a 6000 rpm por 10 min e a 10°C para separação entre o meio de cultura e a biomassa. O sobrenadante foi então usado para as etapas subsequentes. A amostra foi diluída (10-100x) antes de ser analisada com o kit, pois contém componentes do meio de Zarrouk (como bicarbonato de sódio) em concentrações que interferem negativamente as reações do kit. Essa faixa de diluição fornece concentrações de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> abaixo de 2.000 mg.L<sup>-1</sup>, concentração que impossibilita as reações do kit segundo Tzollas et al. (2010).

Nos experimentos realizados em frascos agitados, ensaios de controle da perda de amônia por evaporação foram realizados. A metodologia utilizada para realização desses ensaios controle serão detalhadas no tópico seguinte. Para esses experimentos, a subtração entre a amônia perdida por evaporação (mg.L<sup>-1</sup>) e a concentração de NH<sub>3</sub> no início do experimento foi feita para obter a concentração de NH<sub>3</sub> disponível, que é representada como a concentração inicial de NH<sub>3</sub> (C<sub>i</sub>). Com base nisso, a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, NRE (%), foi calculada de acordo com a Eq. (9). Nos experimentos conduzidos por batelada alimentada, C<sub>i</sub> foi considerado como a soma entre as concentrações de NH<sub>3</sub>(mg.L<sup>-1</sup>) no início do cultivo e as concentrações de nitrogênio amoniacal adicionadas através das soluções de alimentação ao longo do cultivo. C<sub>f</sub> é a concentração final de nitrogênio amoniacal (mg.L<sup>-1</sup>).

$$NRE=((C_i - C_f)/C_i) * 100 \quad (9)$$

Um outro parâmetro calculado no presente estudo foi a eficiência de conversão do nitrogênio amoniacal em biomassa de *A. platensis* CE (%). Esse parâmetro foi determinado de acordo com Liu et al. (2015) sendo mostrado na Eq. (10), onde X<sub>f</sub> é a concentração final de biomassa (g.L<sup>-1</sup>); X<sub>o</sub> é a concentração inicial de biomassa (g.L<sup>-1</sup>); N-NH<sub>3</sub> é a redução de NH<sub>3</sub> no meio (mg.L<sup>-1</sup>) onde é C<sub>i</sub> subtraído de C<sub>f</sub>, e PN (%) é a porcentagem de nitrogênio na biomassa de *A. platensis*. Este método utiliza uma fórmula típica de *Arthrospira*, C<sub>106</sub> H<sub>263</sub> O<sub>110</sub> N<sub>16</sub> P, segundo os estudos de Thorbergsdóttir e Gíslason (2004), em que o valor de PN é de 6,3%.

$$CE (\%) = \frac{X_f - X_o}{N-NH_3} * PN \quad (10)$$

Nos experimentos realizados em garrações aerados e em mixotrofia, o nitrogênio amoniacal total consumido foi calculado usando os resultados da porcentagem do nitrogênio total presente na biomassa produzida pelo bioprocessamento. A estimativa foi feita dessa forma devido à possibilidade do controle da perda de amônia por evaporação por meio de ensaios não inoculados ser comprometido pela contaminação de microrganismos na presença de uma fonte de carbono orgânico em garrações aerados.

Assim, optou-se por uma estimativa mais precisa do nitrogênio amoniacal total consumido realizando uma análise elementar da biomassa produzida (C:H:N). A eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal pelos micro-organismos foi calculada, nesse caso, a partir da porcentagem do nitrogênio amoniacal total consumido pela biomassa produzida em relação ao total do nitrogênio amoniacal adicionado no sistema.

As quantificações de nitrito e nitrato foram realizadas utilizando o sobrenadante da cultura centrifugada, nas mesmas condições citadas anteriormente, após o cultivo dos experimentos em garrações aerados e em mixotrofia. Para análise de nitrito e nitrato, a amostra foi diluída 20x para evitar interferência com os componentes do meio de Zarrouk modificado na análise. Para quantificação de nitrito, foi utilizado o Spectro kit nitrite ntd, Alfakit. O resultado da análise por espectrofotometria a 535 nm foi multiplicado pelo fator 3,28 para obter a concentração de nitrito em  $\text{mg.L}^{-1}$ , conforme as instruções do kit. O nitrato foi analisado por espectrofotometria utilizando o Spectro kit nitrate-nitrite ntd, Alfakit. O resultado da análise por espectrofotometria em 535 nm foi multiplicado por 4,428 para obter a concentração de nitrato em  $\text{mg.L}^{-1}$  seguindo as instruções do kit.

### **3.8.5 Estimativa da perda da amônia por evaporação**

A estimativa da perda de amônia do meio de cultura por evaporação foi realizada de acordo com Álvarez e Otero (2020) em ensaios não inoculados em Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio de Zarrouk modificado com sulfato de amônio. As concentrações de sulfato de amônio de 0,3 e 0,6  $\text{g.L}^{-1}$  foram utilizadas nestes ensaios não inoculados com a intenção de estimar a perda de amônia por evaporação. O pH do meio não inoculado foi aumentado para valores de pH próximos aos dos experimentos inoculados, através da adição de NaOH 1M. Aumentou-se o pH desses controles para avaliar a perda de amônia devido à evaporação relacionada ao aumento do pH das culturas ao longo do cultivo. O pH dos

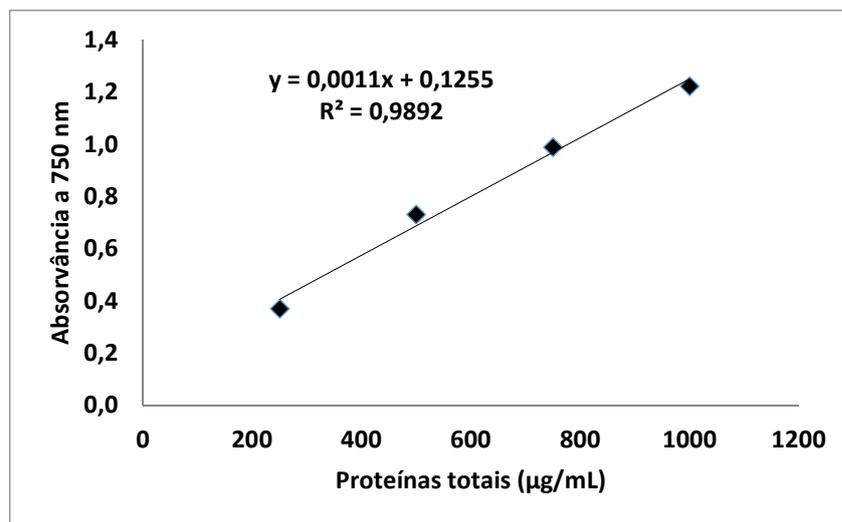
experimentos e dos ensaios de controle de evaporação foi monitorado diariamente por meio da análise com o pHmetro Digimed, modelo DM-22, Brasil.

O Erlenmeyer contendo o meio não inoculado, em triplicata, foi agitado a 150 rpm e mantido a uma temperatura em torno de 24°C, sob a mesma intensidade de luz utilizada nos experimentos anteriores. A diferença entre a concentração inicial e final de nitrogênio amoniacal nos ensaios não inoculados foi considerada como a amônia perdida por evaporação.

### 3.8.6 Quantificação de proteínas totais e nitrogênio (N) na biomassa

Para determinar o percentual de proteínas totais na biomassa liofilizada, foi utilizado o seguinte kit: Total Protein Kit, Micro Lowry, Onishi & Barr Modification (Sigma-Aldrich). Inicialmente, foi feita uma curva de correlação entre as absorvâncias das análises espectrofotométricas e a concentração de proteínas utilizando a albumina sérica bovina (100 µg.mL<sup>-1</sup>) como padrão. A curva pode ser observada no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Correlação entre as absorvâncias, obtidas pelas análises espectrofotométricas a 750 nm, e a concentração de proteínas totais



Fonte: O autor, 2022.

Para extrair as proteínas contidas na biomassa liofilizada, misturou-se 0,02 g a 5 mL de água destilada. Posteriormente, foi feita a diluição de 5x em NaCl (0,85%) na mistura. As etapas do kit foram, então, realizadas para lisar a biomassa em NaOH (94 Mm) e extrair o conteúdo

proteico da biomassa. Os extratos obtidos foram analisados por espectrofotometria visível a 750 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys 10S UV-Vis) para estimar a concentração de proteínas totais através da curva de correlação. Posteriormente, o percentual de proteínas totais na biomassa foi obtido multiplicando-se a concentração de proteína por 100 e dividindo pela concentração de biomassa liofilizada utilizada na extração.

O teor de nitrogênio foi analisado na biomassa produzida no experimento de cultivo mixotrófico de cianobactérias em garrafões aerados. O teor de nitrogênio na biomassa liofilizada recuperada por centrifugação (*A. platensis* e bactérias heterotróficas) foi analisado pela Análise Elementar por Combustão (analisador de elementos: Leco Corporation - Série CHN 628). Esta análise permite obter os resultados da proporção total de carbono, hidrogênio e nitrogênio (C:H:N) na biomassa. Utilizou-se, nessa análise, 0,1 g de biomassa liofilizada. O Detector de Condutividade Térmica foi utilizado para obtenção do percentual de nitrogênio na amostra. A temperatura de digestão foi de 1000°C e o hélio (99,99%) foi usado como gás de arraste sob atmosfera de O<sub>2</sub>. A análise foi realizada em triplicata.

### **3.8.7 Quantificação de glicerol e caracterização do Glicerol Bruto Residual**

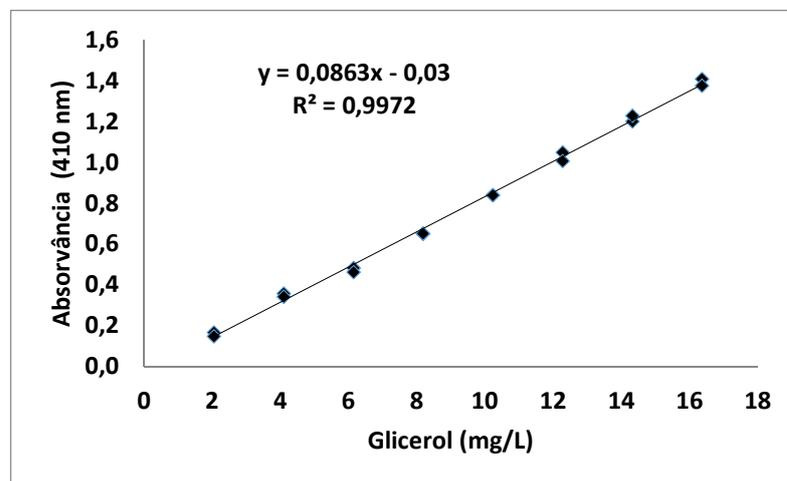
O glicerol bruto coproduto da produção de biodiesel foi doado pelo Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes – LACOI, INT/RJ. O glicerol bruto residual foi obtido a partir da produção de biodiesel por meio da transesterificação de uma mistura composta por 60% de óleo de soja e 40% de sebo. Este resíduo foi mantido em um funil de separação até a separação completa das duas fases. Apenas a fração menos densa foi utilizada para não aumentar significativamente a turbidez do meio e evitar a dispersão da luz. A determinação dos teores de carbono, hidrogênio e nitrogênio do glicerol bruto foi realizada de acordo com o método padrão ASTM D5453 no analisador elementar CHN628, LECO (CORRÊA; TEIXEIRA, 2021). Para determinação do teor de cinzas, 1 g de glicerol bruto residual foi colocado em um cadinho para queima em um forno mufla (Fornitec, Brasil) a 750 °C por 3 h. O glicerol bruto residual utilizado no presente estudo é constituído de 29,92% de carbono, 0,02% de nitrogênio e 3,99% de cinzas (CORRÊA; TEIXEIRA, 2021).

Um método espectrofotométrico foi utilizado para quantificar o glicerol no meio de cultura baseado em Abomohra et al. (2018) e Bondioli e Della bella (2005). Inicialmente, foi elaborada uma curva de correlação entre os valores de absorvância obtidos pela análise

espectrofotométrica e os valores das concentrações de glicerol (Gráfico 4). Foram utilizadas diluições de uma solução padrão de glicerol (padrão analítico, P.A, Alphatec,  $\geq 99,5\%$ ) com a concentração de  $0,03 \text{ g.L}^{-1}$  em solução de etanol (47,5%). O mesmo solvente foi utilizado para realizar as diluições com volume final de 2 mL para elaboração da curva. As mesmas etapas, mencionadas a seguir, foram utilizadas para analisar as amostras oriundas dos experimentos.

Para a quantificação de glicerol na cultura, foi realizada a centrifugação da cultura (4500 rpm por 20 minutos a  $10^\circ\text{C}$ ) no início e ao final do experimento para proporcionar a separação entre o meio e a biomassa. As amostras do início do bioprocessamento (30  $\mu\text{L}$ ) foram diluídas em 4970  $\mu\text{L}$  de água destilada e as amostras finais (1 mL) foram diluídas em 4 mL de água destilada. Posteriormente, em ambos os casos, foram adicionados 5 mL de uma solução de etanol (47,5%). Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de uma solução de periodato de sódio (10 mM). Essa solução foi preparada dissolvendo o periodato de sódio em 25 mL de uma solução de ácido acético (1,6 M) e 25 mL de acetato de amônio (4 M).

Gráfico 4 – Correlação entre as absorvâncias, obtidas pelas análises espectrofotométricas a 410 nm, e a concentração de glicerol



Fonte: O autor, 2022.

Os ensaios foram agitados por 30s. Subsequentemente, adicionou-se 1,2 mL de uma solução de acetilacetona (0,2 M). Para preparar essa solução, misturou-se 1 mL de acetilacetona a 25 mL de ácido acético (1,6 M) e 25 mL de acetato de amônio (4 M). Após a adição de acetilacetona, os ensaios foram mantidos a  $70^\circ\text{C}$  por 1 min com agitação manual.

Posteriormente, os ensaios foram colocados em banho a 10°C por 10 s visando interromper a reação. Por fim, foi realizada a leitura a 410 nm (espectrofotômetro Thermo Scientific™ Genesys 10S UV-Vis) para obtenção dos valores de absorvância e das concentrações de glicerol por meio da curva de correlação. A solução composta por 5 mL de etanol (47,5%) e 5 mL de água destilada foi utilizada como branco.

### **3.8.8 Quantificação de biopolímeros (polihidroxicarboxilatos)**

A extração de polihidroxicarboxilatos (biopolímeros) foi realizada de acordo com Costa et. al. (2018) com pequenas modificações. Apesar de ainda não ser um método para extração de biopolímeros ambientalmente correto pelo uso de solventes orgânicos, optou-se por essa metodologia por ser um método padrão para extração e quantificação dos PHA, já que o presente estudo não teve foco no aprimoramento dessa metodologia.

A primeira etapa consistiu na lise celular com hipoclorito de sódio (4-6%). O hipoclorito de sódio (30 mL) foi misturado a 1 g de biomassa liofilizada, recuperada por centrifugação ou liofilização. A mistura foi agitada em vórtex por 1 min, até que a mudança de cor de verde para amarelo fosse observada. A mistura foi então incubada a 45°C por 20 min.

Posteriormente, foi realizada a centrifugação para remoção do hipoclorito a 6000 rpm por 15 min a 10°C e uma etapa de lavagem foi realizada em água destilada nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Subsequentemente, 30 mL de clorofórmio (padrão analítico, P.A) foram adicionados ao pellet contendo a biomassa e os biopolímeros. A mistura foi condicionada a 80°C por 3 h em sistema de refluxo para proporcionar a extração dos biopolímeros (Figura 17). A biomassa residual foi separada do solvente contendo os biopolímeros por filtração a vácuo (membranas de fibra de vidro de 0,7µm-Macherey-Nagel). O filtrado foi rotoevaporado a 50°C, a 150 rpm, até que aproximadamente 5 mL do solvente contendo os biopolímeros fossem retidos. Em seguida, os biopolímeros foram precipitados com 45 mL de metanol refrigerado (padrão analítico, P.A) por 10 min em banho de gelo.

Figura 17- Etapas para extração de polihidroxialcanoatos da biomassa do cultivo misto de *A. platensis* e bactérias heterotróficas



Legenda: Fotos dos resultados das principais etapas envolvidas na metodologia de extração de biopolímeros (polihidroxialcanoatos) utilizada no presente estudo. Fonte: O autor, 2022.

Os biopolímeros foram, então, recuperados por centrifugação (6000 rpm, 15 min, 10°C) e secos em estufa de circulação de ar a 60°C por 24-48 h. Os polihidroxialcanoatos produzidos foram quantificados por gravimetria. A concentração de polihidroxialcanoatos na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) foi estimada de acordo com a Eq. (11). PHA é a massa de polihidroxialcanoatos (mg) por massa de biomassa (g), mp é a massa de PHA (g) e m é a massa de biomassa utilizada na extração (g).

$$\text{PHA} = (\text{mp}/\text{m}) \cdot 1000 \quad (11)$$

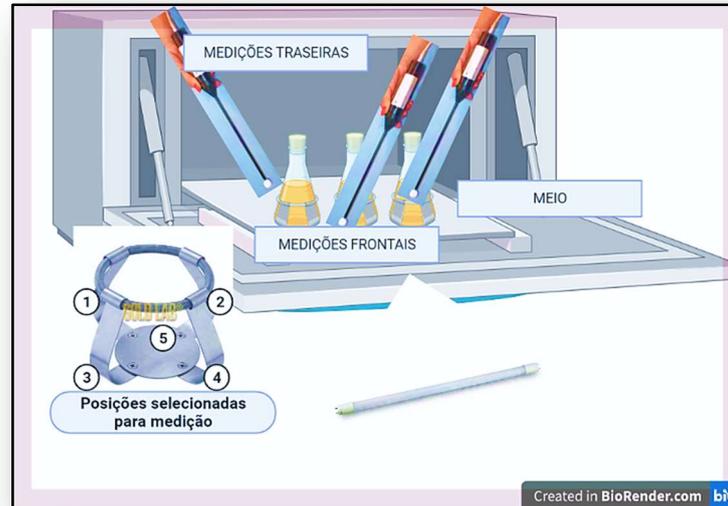
### 3.8.9 Estimativa da Densidade de Fluxo Fotônico (D.F.F) dos experimentos

Para os ensaios em frascos agitados, inicialmente, foram feitas 5 medições externas à cultura dos micro-organismos, descritas na Figura 18, nas 5 posições de cada garra da mesa agitadora. Utilizou-se o dosímetro da marca Biospherical Instrument, QSL 2100. A média entre essas medições permite obter uma estimativa da densidade de fluxo fotônico média de cada

garra (aonde ficou situado cada Erlenmeyer com as culturas do experimento). Posteriormente, foi calculada a média da densidade de fluxo fotônico de todas as garras da mesa agitadora, obtendo, assim, a estimativa da densidade de fluxo fotônico utilizada no experimento. Essa estimativa pode ser realizada já que, a cada dia, os frascos Erlenmeyer ocupavam posições aleatórias, em sistema de rodízio, na mesa agitadora. A metodologia utilizada foi desenvolvida no LABIM-INT.

O posicionamento utilizado para dosimetria dos experimentos realizados em garrações de 5L encontra-se na Figura 19. Foram feitas medições externas ao cultivo, na própria face do garrafão em contato com a luz do Plafon. Foram feitas medições em cinco posições: posição superior esquerda, superior direita, inferior esquerda, inferior direita e meio. Calculou-se posteriormente a média da densidade de fluxo fotônico obtidas nessas posições para estimativa da D.F.F dessa condição experimental.

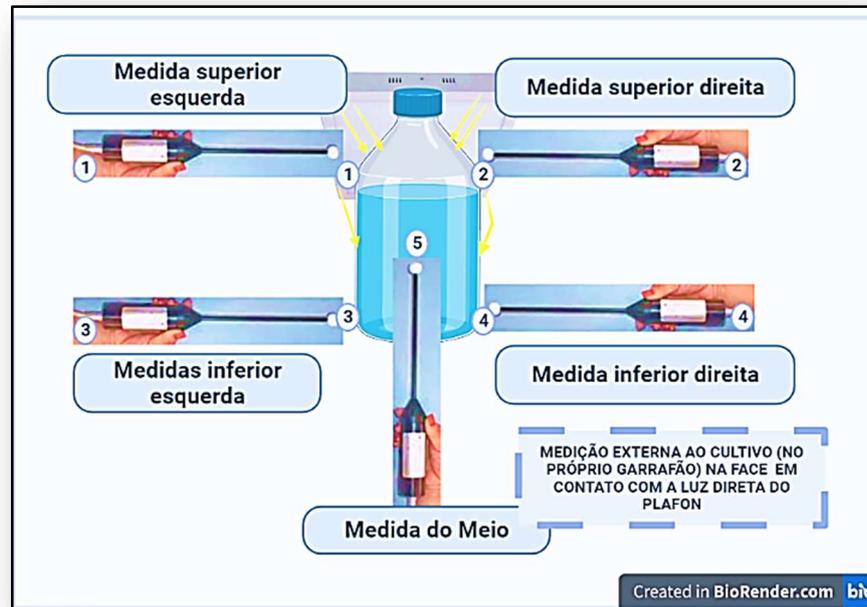
Figura 18 – Esquema das posições utilizadas para medição da densidade de fluxo fotônico dos ensaios em frascos agitados



Legenda: Baseou-se nos vértices da garra da mesa agitadora para determinar as posições para dosimetria sendo realizadas 5 medições com as posições descritas na imagem.

Fonte: O autor, 2022.

Figura 19- Esquema das posições utilizadas para medição da densidade de fluxo fotônico dos ensaios em garrações de 5 L



Fonte: O autor, 2022.

### 3.9 Análises estatísticas

O software StatSoft STATISTICA 7.0 foi utilizado para realizar a análise de variância unidirecional (ANOVA). O nível de significância adotado foi de 95% ( $p \leq 0,05$ ). O GraphPad Prism 8 e o Origin 2020 foram utilizados para elaborar os gráficos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Comparação do cultivo de cianobactérias em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal

Para o estudo comparativo do desempenho de crescimento das três espécies de cianobactérias em nitrogênio amoniacal, foram selecionadas diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal com base nos estudos apresentados na Tabela 4.2. Não houve crescimento significativo de *Arthrospira platensis*, *Synechocystis* D202 e *Spirulina labyrinthiformis* na concentração de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio (Tabela 4.1). Os resultados de crescimento, nas demais concentrações de sulfato de amônio avaliadas, foram apresentados na Tabela 4.1. Os gráficos referentes às análises estatísticas dos dados da Tabela 4.1 encontram-se no Anexo A. Os experimentos controle foram realizados em 0,25 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio (equivalente em nitrogênio a 0,194 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio) e 0,128 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio, que é em torno de 30% menor que o equivalente em nitrogênio da concentração de sulfato de amônio de 0,147 g.L<sup>-1</sup>. Essa estratégia foi utilizada para diferenciar a possível diminuição do crescimento devido às baixas concentrações de nitrogênio da queda de crescimento relacionada à toxicidade do nitrogênio amoniacal.

As produtividades em biomassa de *Arthrospira platensis* em sulfato de amônio (0,147 e 0,194 g.L<sup>-1</sup>) e nas duas concentrações correspondentes de nitrato de sódio (culturas controle) não apresentaram diferença estatística significativa (0,190; 0,197; 0,178; 0,175 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) após 6 dias de cultivo. Esse dado corrobora com o perfil similar de crescimento de *A. platensis* nessas condições (Gráfico 5). Por outro lado, para *Spirulina labyrinthiformis*, houve diferença entre os dados da produtividade em biomassa nas duas concentrações de sulfato de amônio analisadas (0,130; 0,197 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e entre o sulfato de amônio com concentração de 0,194 g.L<sup>-1</sup> (0,197 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e o controle com nitrato de sódio a 0,25 g.L<sup>-1</sup> (0,113 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>).

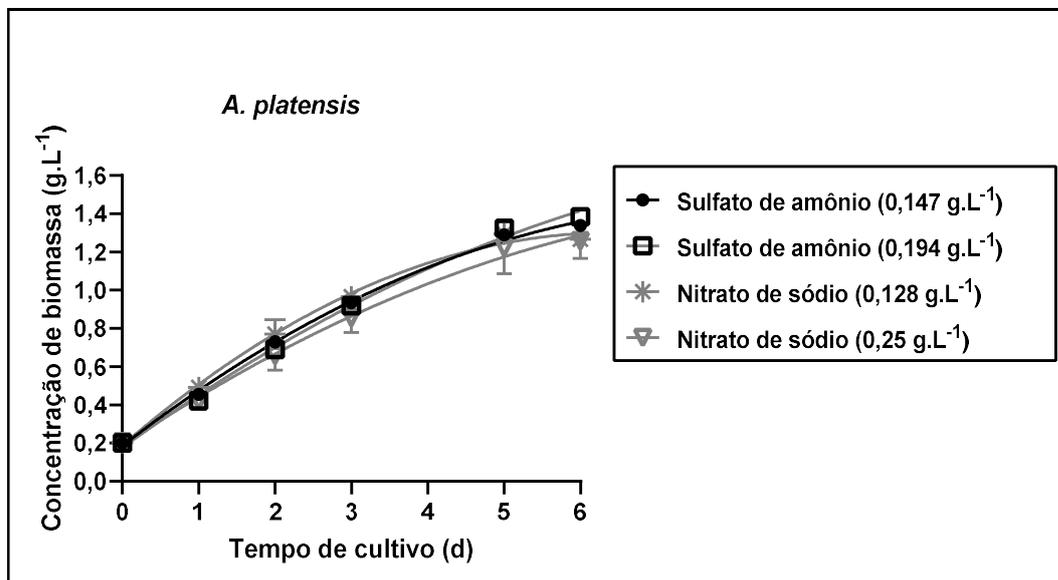
A *Synechocystis* D202 apresentou uma baixa produtividade de biomassa e a menor em comparação às demais cianobactérias, nas duas fontes de nitrogênio avaliadas (Gráfico 6). As maiores produtividades em biomassa foram 0,045 e 0,047 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em nitrato de sódio a 0,128 e 0,25 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* se destacaram em relação à *Synechocystis* D202 apresentando maiores produtividades em biomassa.

Tabela 4.1 - Produtividade em biomassa e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal das três cianobactérias estudadas em diferentes concentrações de sulfato de amônio e condição de controle em nitrato de sódio. Os dados da tabela são mostrados com desvio padrão. As letras diferentes de uma mesma coluna indicam diferenças estatisticamente significativas entre os dados analisados pelo teste de Tukey (alfa de 0,05).

Fonte de nitrogênio (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade em biomassa Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) <i>Arthrospira platensis</i>	Eficiência de remoção de N- amoniacal (%) <i>Arthrospira platensis</i>	Produtividade em biomassa Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) <i>Synechocystis D202</i>	Eficiência de remoção de N- amoniacal (%) <i>Synechocystis D202</i>	Produtividade em biomassa Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) <i>Spirulina labyrinthiformis</i>	Eficiência de remoção de N- amoniacal (%) <i>Spirulina labyrinthiformis</i>
Sulfato de amônio (0,147 g.L <sup>-1</sup> )	0,190 ±0.007 <sup>a</sup>	99,6 ±0.2 <sup>a</sup>	0,015 ±0.004 <sup>a</sup>	100 ±0 <sup>a</sup>	0,130 ±0,009 <sup>c</sup>	99,8 ±0. <sup>a</sup>
Sulfato de amônio (0,194 g.L <sup>-1</sup> )	0,197 ±0.006 <sup>a</sup>	99,4 ±0.3 <sup>a</sup>	0,0004 ±0.0006 <sup>c</sup>	18,39±9,8 <sup>b</sup>	0,197 ±0,018 <sup>b</sup>	99,7 ±0. <sup>a</sup>
Nitrato de sódio (0,128 g.L <sup>-1</sup> )	0,178±0.004 <sup>a</sup>	–	0,045±0,001 <sup>b</sup>	–	0,157±0,015 <sup>b,c</sup>	–
Nitrato de sódio (0,25 g.L <sup>-1</sup> )	0,175 ±0.015 <sup>a</sup>	–	0,047±0,001 <sup>b</sup>	–	0,113 ±0,009 <sup>c</sup>	–

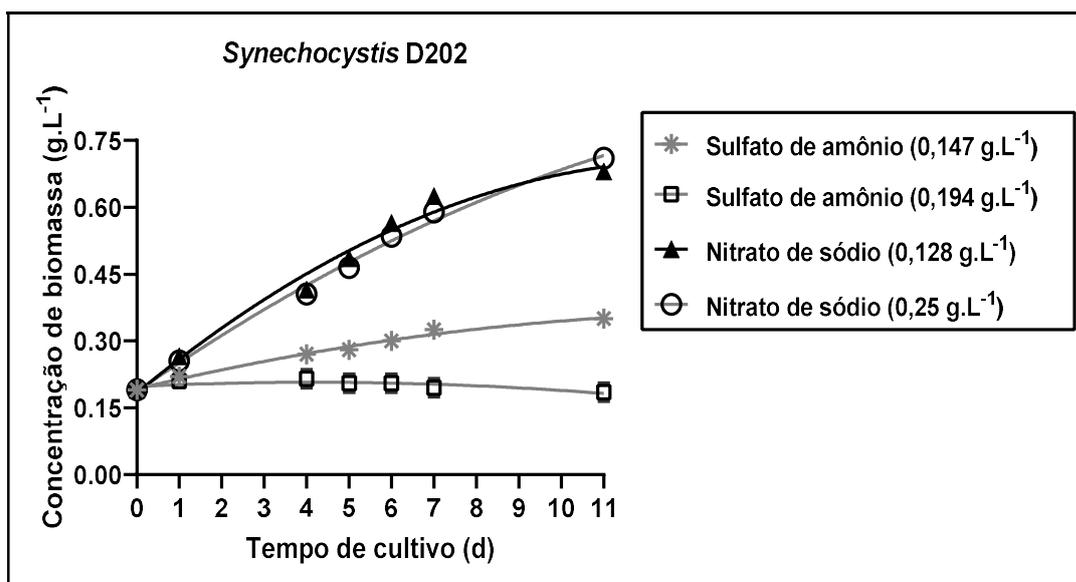
Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 5 – Perfil de crescimento de *A. platensis* em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal e em culturas controle com nitrato de sódio



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 6 – Perfil de crescimento de *Synechocystis* D202 em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal e em culturas controle com nitrato de sódio



Fonte: O autor, 2022.

Tabela 4.2 – Exemplos de estudos relacionados à remoção de nitrogênio amoniacal por microalgas e cianobactérias.

Micro-organismo	Meio de cultivo	Concentração final em biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Produtividade em biomassa Q <sub>x</sub> ( g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	N-Amoniacal removido (mg.L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Spirulina platensis</i>	Meio Zarrouk substituindo o nitrato de sódio por sulfato de amônio (0,66 g.L <sup>-1</sup> )	0,081	–	Ausência da remoção de nitrogênio amoniacal	COSTA et al., 2001
<i>S. platensis</i> UTEX 1926	Meio Schlosser substituindo o nitrato de sódio por sulfato de amônio (0,07 g.L <sup>-1</sup> )	0,64	0,048	Remoção total de nitrogênio amoniacal	SOLETTO et al., 2005
<i>S. platensis</i> UTEX 1926	Meio Schlosser substituindo o nitrato de sódio por sulfato de amônio em batelada alimentada (concentração final de 0,33 g.L <sup>-1</sup> )	1,2	0,06	–	SOLETTO et al., 2005
<i>Spirulina platensis</i> (UTEX 1926)	Meio Schlosser substituindo o nitrato	-	0,04	Remoção total de nitrogênio amoniacal	CONVERTI et al., 2006

	de sódio por cloreto de amônio (0,058 g.L <sup>-1</sup> )				
<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	Meio Schlosser substituindo o nitrato de sódio por sulfato de amônio em batelada alimentada (total adicionado 0,99 g.L <sup>-1</sup> )	2,9	0,179	–	RODRIGUES et al., 2011
<i>Chlorella vulgaris</i>	Efluente da produção de bovinos diluído (10x)	–	0,23 ± 0,04	152	FRANCHINO et al., 2013a
<i>A. platensis</i> SAG 21.99	Meio Zarrouk substituindo o nitrato de sódio por cloreto de amônio	–	–	60*	MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014
<i>Arthrospira platensis</i>	Efluente da produção de suínos diluído (10x)	1,519±38	–	128*	MARKOU, 2015a

<i>Spirulina platensis</i>	Efluente sintético simulando as concentrações dos compostos presentes em um efluente municipal	0,32	–	20,58	ZHAI et al., 2017
<i>Parachlorella kessleri</i>	Mistura de efluentes da digestão anaeróbica da indústria de queijo, suínos, aves e bovinos	1,1	–	49,7	KOUTRA; GRAMMATIKOPOU LOS; KORNAROS, 2017
<i>Arthrospira platensis</i>	Meio Zarrouk substituindo o nitrato de sódio por cloreto de amônio (1,53 g.L <sup>-1</sup> )	Ausência da produção de biomassa	–	Ausência da remoção de nitrogênio amoniacal	KHAZI; DEMIREL; DALAY, 2018

Fonte: O autor, 2022.

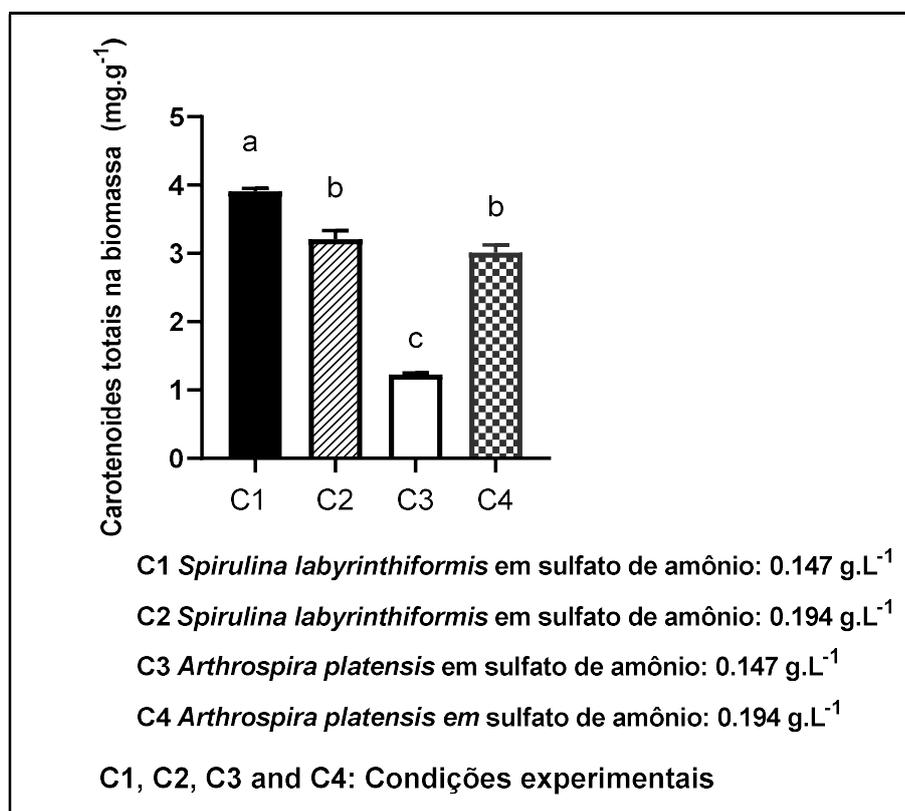
Todas as condições foram satisfatórias para *Arthrospira platensis*, e para *Spirulina labyrinthiformis*, a melhor condição foi sulfato de amônio a  $0,194 \text{ g.L}^{-1}$ , seguido por nitrato de sódio a  $0,128 \text{ g.L}^{-1}$ . Portanto, tanto a cianobactéria *Arthrospira platensis* quanto a *Spirulina labyrinthiformis* mostraram-se promissoras para o cultivo em meio amoniacal. A Tabela 4.1 também relata a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal (NRE) por *Arthrospira platensis*, *Spirulina labyrinthiformis* e *Synechocystis* D202 nas condições avaliadas. Na concentração mais alta de sulfato de amônio, nenhuma das cianobactérias foi capaz de consumir o nitrogênio amoniacal devido a ausência de crescimento. Eficiências semelhantes de remoção de nitrogênio amoniacal de quase 100% foram observadas para *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em todas as condições (exceto para sulfato de amônio a  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , como mencionado previamente). Por outro lado, *Synechocystis* D202 só atingiu este valor na menor concentração de sulfato de amônio avaliada ( $0,147 \text{ g.L}^{-1}$ ).

De acordo com o potencial de *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* para a produção de carotenoides, buscou-se avaliar o teor desses compostos nas biomassas. O Gráfico 7 mostra o conteúdo de carotenoides totais nas biomassas de *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* produzidas no meio de Zarrouk com sulfato de amônio. A análise estatística realizada nesse gráfico encontra-se no anexo A. Houve diferença significativa (alfa de 0,05) entre o maior teor de carotenóides totais ( $3,91 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$ ) em *Spirulina labyrinthiformis* e *Arthrospira platensis* ( $3,01 \pm 11 \text{ mg.g}^{-1}$ ) em meio de Zarrouk com  $0,147 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,194 \text{ g.L}^{-1}$  de sulfato de amônio, respectivamente.

É importante destacar que severas condições de cultivo foram utilizadas para o cultivo das três cianobactérias avaliadas no presente estudo. O pH do meio de Zarrouk (próximo a 9,2) proporciona a presença de uma grande parcela do nitrogênio amoniacal, oriundo do sulfato de amônio, na forma de amônia, devido à constante de dissociação iônica (pKa) entre  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ , que é 9,25 (MARKOU; MUYLAERT, 2016; TIAN et al., 2018).

Markou, Vandamme e Muylaert (2014) relataram que o pH do meio ao longo do cultivo pode atingir valores acima de 9,2 e que essa faixa de pH leva à perda de amônia por volatilização. Em contraste, essa perda de amônia pode ser diminuída porque a amônia é solúvel em lipídios e atravessa as membranas celulares por difusão, aumentando a assimilação de  $\text{NH}_3$  pela cianobactéria. Isso explica como o nitrogênio amoniacal atinge concentrações tóxicas em meio com pH acima de 9,2.

Gráfico 7 – Produção de carotenoides totais por *Arthrospira platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em meio de Zarrouk com sulfato de amônio. As barras de erro representam o desvio padrão. As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os resultados analisados pelo teste de Tukey (alfa de 0,05).



Fonte: O autor, 2022.

Por outro lado, o íon amônio, espécie presente em pH mais baixo, não é assimilado por difusão e sua assimilação é por transporte ativo, gerando, portanto, menor toxicidade devido ao melhor controle de sua entrada pela cianobactéria. Além do pH relativamente alto no início do cultivo, ele tende a aumentar ao longo do cultivo, o que requer estratégias para lidar com a toxicidade da amônia e promover a produção de biomassa (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014; SANKARAN; PREMALATHA, 2018).

A primeira estratégia abordada neste estudo para remoção de nitrogênio amoniacal foi realizar um levantamento utilizando diferentes espécies de cianobactérias em relação à sua capacidade de crescer em meios contendo nitrogênio amoniacal. As espécies escolhidas são promissoras quanto ao seu potencial biotecnológico, além de aspectos positivos relacionados a facilidade de cultivo e do potencial para produção de biomassa em elevada produtividade (quando comparada as demais microalgas). As cianobactérias *Arthrospira platensis* e *Spirulina*

*labyrinthiformis* também apresentam a vantagem da facilidade de recuperação, pois são filamentosas.

Dentre as três espécies estudadas, o gênero *Synechocystis* foi selecionado por diversos autores como Ansari e Fatma (2016), Meixner et al. (2018), Kamravamanesh et al. (2017), Kovalcik et al. (2017) e Carpine et al. (2019) relatarem essas cianobactérias como um gênero promissor para produzir biopolímeros biodegradáveis (polihidroxicarboxilatos). Existem poucos relatos usando *Synechocystis* sp. além dos estudos de Neilson e Larsson (1980) e Drath e colaboradores (2008), que mostraram que este gênero apresenta alta sensibilidade a toxicidade de compostos amoniacais. No entanto, a sensibilidade depende da linhagem de cianobactéria e a linhagem estudada no presente trabalho apresentou um crescimento satisfatório em meio convencional, o que sugeriu sua escolha para o presente estudo.

Em relação a *Synechocystis* sp., houve consumo de amônia (100%) apenas em 0,147 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio; em maiores concentrações de sulfato de amônio (0,194 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>), o crescimento foi bastante afetado e não houve consumo. Neilson e Larsson (1980) observaram que a concentração de nitrogênio amoniacal de 2.000 µM (0,264 g.L<sup>-1</sup>) é tóxica para *Synechocystis* sp.

Ao comparar o desempenho de crescimento das três espécies de cianobactérias em meio amoniacal, o cultivo com 0,194 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio produziu *Arthrospira platensis* com produtividade superior à obtida em Soletto et al. (2005) e Converti et al. (2006) (Tabela 4.2). A maior produtividade em biomassa obtida pode ser atribuída a diferenças nas condições de cultivo, como o meio de cultura e a intensidade luminosa utilizados no presente estudo, em comparação às utilizadas em Soletto et al. (2005) e Converti et al. (2006), bem como a cepa utilizada. Vale ressaltar que, até onde sabemos, este é o primeiro estudo publicado sobre o uso biotecnológico de *Spirulina labyrinthiformis*.

Além de consumir nitrogênio amoniacal e produzir biomassa, a produção de compostos de alto valor agregado a partir da cianobactéria é estratégica, por isso, alguns compostos de interesse comercial foram analisados no presente estudo. Os primeiros, os carotenóides, são compostos de interesse industrial devido a sua vasta aplicação como compostos bioativos, especialmente em sua atividade antioxidante. Isso justifica o mercado esperado de US\$ 1,4 bilhão em 2018 de β-caroteno e astaxantina (PATIAS et al., 2017). Espécies de microalgas como *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* têm sido amplamente estudadas para a produção de carotenóides. Pereira e Otero (2019), Moura et al. (2020) e Zhao et al. (2019) são alguns exemplos de estudos em que elevadas concentrações de carotenóides são alcançadas

(120 mg.g<sup>-1</sup>, 52,0±7,2 mg.g<sup>-1</sup>, 21,5 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente) por *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*.

Apesar das concentrações de carotenoides totais produzidas por *Spirulina labyrinthiformis* e *A. platensis* serem mais baixas, essas espécies de cianobactérias são de fácil recuperação através do uso de processos menos onerosos como a filtração (SINGH; PATIDAR, 2018). Além disso, o meio de cultura para *Spirulina labyrinthiformis* e *A. platensis*, não é constituído de água do mar. Dependendo da localização da indústria pode haver a complexidade do uso de água do mar em produções em larga escala (GEORGE, 1976).

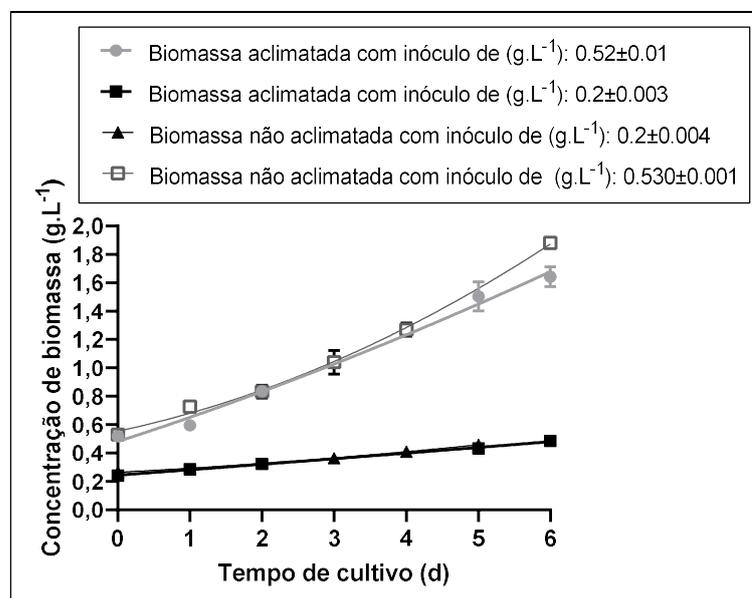
Neste estudo, em condições de cultivo não otimizadas, maiores concentrações de carotenóides totais foram alcançadas por *A. platensis* (3,01±0,11 mg.g<sup>-1</sup>) em comparação com os relatados por diferentes estudos: Rodrigues et al. (2014), Rodrigues et al. (2015), Ismaiel; El-ayouty e Piercey-normore (2016), Guan et al. (2017) e Patias et al. (2017). O acúmulo de carotenóides totais (3,91±0,04 mg.g<sup>-1</sup>) por *Spirulina labyrinthiformis*, foi ainda maior do que o alcançado por *A. platensis*, e não foram encontrados relatos sobre a produção de carotenoides por essa espécie.

Para os experimentos seguintes com o objetivo de avaliar estratégias para aumentar o consumo de nitrogênio amoniacal por cianobactérias, a cianobactéria *Arthrospira platensis* foi escolhida devido a produtividade em biomassa e ao teor de carotenoides satisfatórios em fontes amoniacaais. Em geral, a *Spirulina labyrinthiformis* apresentou resultados similares a *Arthrospira platensis*, mas devido a formação de aglomerados celulares, ao longo do cultivo, dificultarem a avaliação do crescimento e a quantificação da biomassa, optou-se, portanto, por dar prosseguimento ao presente estudo com *A. platensis*.

#### **4.2 Comparação de estratégias para melhor aproveitamento do nitrogênio amoniacal por *Arthrospira platensis*: aumento de inóculo e aclimação celular**

A produtividade em biomassa das células aclimatadas foi comparada às não-aclimatadas realizadas com inóculo produzido no meio de Zarrouk (com nitrato de sódio). Essa estratégia de aclimação também foi comparada à estratégia do aumento da concentração inicial de biomassa. Como pode ser observado na Tabela 4.3 e no Gráfico 8, a aclimação não influenciou no crescimento de *Arthrospira platensis* em 0,6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio.

Gráfico 8 – Comparação de estratégias para o aumento da produção de *A. platensis* em meio amoniacal



Fonte: O autor, 2022.

Tabela 4.3 - Parâmetros da produção de *Arthrospira platensis* em 0,6 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio após 6 d de crescimento. Diferentes concentrações iniciais de biomassa foram comparadas avaliando-se também o efeito da aclimação na produtividade da biomassa e no consumo de nitrogênio amoniacal. X representa a concentração final de biomassa e Qx a produtividade volumétrica de biomassa. Os resultados de cada parâmetro (X, Qx, NH<sub>3</sub> consumido e eficiência de remoção de NH<sub>3</sub>) com desvio padrão foram analisados separadamente pelo teste de Tukey (alfa de 0,05). Letras diferentes de um mesmo parâmetro representam diferenças estatisticamente significativas entre os dados analisados.

Condições experimentais	X (g/L)	Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Eficiência de remoção de N-amoniacal (%)	NH <sub>3</sub> Consumido (mg.L <sup>-1</sup> )
Biomassa aclimatada com inóculo de 0,2±0,003(g.L <sup>-1</sup> )	0,48±0,02 <sup>a</sup>	0,044±0,002 <sup>a</sup>	23,30±0,88 <sup>a</sup>	18,2±0,4 <sup>a</sup>
Biomassa não-aclimatada com inóculo de 0,2±0,004(g.L <sup>-1</sup> )	0,457±0,005 <sup>a</sup>	0,04291±0,0008 <sup>a</sup>	23,63±0,93 <sup>a</sup>	19±1 <sup>a</sup>
Biomassa aclimatada com inóculo de 0,52±0,01(g.L <sup>-1</sup> )	1,64±0,08 <sup>b</sup>	0,187±0,011 <sup>b</sup>	99,67±0,15 <sup>b</sup>	78±1 <sup>b</sup>
Biomassa não-aclimatada com inóculo de 0,530±0,001(g.L <sup>-1</sup> )	1,89±0,02 <sup>c</sup>	0,225±0,004 <sup>c</sup>	92,49±1,01 <sup>c</sup>	71±7 <sup>b</sup>

Fonte: O autor, 2022.

Quando foi utilizada a menor concentração inicial de biomassa ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ), as concentrações finais de biomassa das culturas utilizando inóculos aclimatados e não aclimatados ( $0,48 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,457 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente) não apresentaram diferenças significativas. O mesmo foi observado para os seguintes parâmetros avaliados: produtividade de biomassa,  $\text{NH}_3$  consumido e eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal. Vale ressaltar que a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi inferior a 50% e para essas situações ainda permaneceu no meio em torno de  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ .

A outra estratégia foi avaliar o aumento da concentração inicial de biomassa, uma vez que a biomassa, em maiores quantidades, poderia levar a uma maior assimilação inicial de nitrogênio amoniacal. Assim, foi utilizada a condição com a concentração inicial de biomassa de  $0,52 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ . Conforme mostrado na Tabela 4.3, diferentemente das demais condições analisadas, a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal foi alta, próxima de 100%, e o maior consumo de nitrogênio amoniacal foi de  $78,0 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$ . Além disso, foram alcançadas maiores produtividades em biomassa ( $0,225 \pm 0,004$  e  $0,187 \pm 0,011 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) nos ensaios com maiores concentrações iniciais de biomassa. Os experimentos com maior inóculo tiveram as seguintes concentrações finais de biomassa:  $1,89 \pm 0,2$  e  $1,64 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$ .

Wang et al. (2018) utilizaram a estratégia de aclimatação de *Chlorella vulgaris* em concentrações crescentes de 4-clorofenol presente no lodo do sistema de tratamento através de sucessivos ciclos de cultivo com aumento gradual da concentração deste composto. Após análise proteômica da biomassa, observaram a menor expressão de proteínas relacionadas ao estresse metabólico e obtiveram maiores concentrações da biomassa que passou por ciclos de aclimatação quando comparada à biomassa não aclimatada. No entanto, observou-se que, nas condições analisadas do presente estudo, a aclimatação celular não promoveu o aumento na produtividade em biomassa quando na concentração inibitória de nitrogênio amoniacal nos experimentos com inóculos de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ . Por outro lado, a terceira estratégia de aumentar a concentração inicial de biomassa potencializou o consumo de nitrogênio amoniacal e a produtividade da biomassa.

Em relação à estratégia de aumentar a eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal através do aumento do inóculo, Markou et al. (2014) relataram resultados extremamente satisfatórios. A cianobactéria *A. platensis* SAG 21.99 foi cultivada em meio de Zarrouk substituindo nitrato de sódio por cloreto de amônio e utilizando inóculos de 0,125, 0,25 e 0,5  $\text{g.L}^{-1}$ . Além de citarem uma menor inibição da cianobactéria pelo nitrogênio amoniacal devido à sua rápida assimilação e ao aumento do inóculo, concluem que, em condições com maior inóculo, houve menor perda de amônia por volatilização. Este fato pode ser explicado pela

maior concentração de biomassa inicial poder levar a um aumento da difusão da amônia através das membranas celulares, impedindo que parte da amônia seja volatilizada.

Markou et al. (2014) relataram que, em  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de inóculo de *A. platensis* SAG 21,99 em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal, considerando 40% de perdas de amônia por volatilização, aproximadamente  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal foi consumido. Um fato importante que justifica a diferença de nitrogênio amoniacal consumido entre o estudo de Markou et al. (2014) e o presente estudo, no qual, aproximadamente,  $77,9 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$  foram consumidos em batelada simples por *A. platensis*, é que em experimentos aerados, como o citado, há maior perda de amônia devido a volatilização quando comparado aos experimentos mecanicamente agitados, realizados no presente estudo. Talvez a intensidade da luz também tenha influenciado nesse resultado, pois em Markou et al. (2014), foram utilizadas intensidades de luz menores em comparação às utilizadas no presente estudo.

A Tabela 4.2 resume alguns estudos de produção de microalgas e cianobactérias em fontes de nitrogênio amoniacal. No presente estudo, o experimento em batelada simples e com concentração inicial de biomassa de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  proporcionou a remoção de nitrogênio amoniacal em maiores concentrações e em maior produtividade em biomassa em comparação aos resultados alcançados nos seguintes estudos que avaliaram a produção de *Spirulina platensis* e *Arthrospira platensis* em batelada simples: Costa et al. 2001; Soletto et al. 2005; Converti et al. 2006; Markou et al. 2014; Zhai et al. 2017. Diante disso, optou-se por utilizar a estratégia do aumento de inóculo em sinergia à condução do bioprocesso por batelada alimentada no experimento seguinte.

### **4.3 Avaliação da mudança do modo de condução do bioprocesso para batelada alimentada para assimilação do nitrogênio amoniacal por *A. platensis***

A Figura 20 retrata os experimentos realizados com elevada concentração inicial de biomassa em um bioprocesso conduzido por batelada alimentada. Antes desses experimentos serem realizados, foi realizado um experimento em batelada alimentada e utilizando-se uma concentração inicial de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  para alimentação de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  nas duas condições avaliadas (inóculo de  $0,5$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ). No entanto, à medida que o pH do meio aumentou ao longo do cultivo, a toxicidade de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  no início do experimento (no qual o pH

é 9,2) foi menor que a toxicidade dessa mesma concentração de  $\text{NH}_3$  durante a primeira alimentação, em que o pH do cultivo aumentou para valores próximos de 10. Por isso não obtivemos sucesso neste experimento (dados não apresentados). Portanto, optamos por realizar este experimento com  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  em um pH inicial de 8,5 (esperando um consumo mais rápido) e uma diminuição do pH da cultura através de alimentações mais frequentes com as soluções de alimentação acidificadas e contendo nitrogênio amoniacal.

Os resultados desse experimento são mostrados no Gráfico 9 e Tabela 4.4. Até o sexto dia de crescimento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os experimentos em meio de Zarrouk com sulfato de amônio e seus respectivos controles em nitrato de sódio (equivalente em nitrogênio à concentração inicial de sulfato de amônio de  $0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ). As concentrações finais de biomassa de *A. platensis*, no sexto dia, nos experimentos em nitrogênio amoniacal com inóculo de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$  foram  $1,52 \pm 0,06$  e  $2,15 \pm 0,26 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente (Gráfico 9A). Ao final do experimento (13 d), foram alcançadas concentrações finais de biomassa de  $1,77 \pm 0,26$  e  $2,04 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$  para os experimentos com inóculo de  $0,5$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente.

Figura 20 – Conjunto de experimentos com elevada concentração inicial de *A. platensis* ( $0,5$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e conduzido por batelada alimentada em fonte amoniacal, além de ensaios não inoculados de controle de evaporação da amônia. Foto tirada no início do experimento.



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 9 – Perfil de crescimento de *A. platensis* com inóculos de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup> e concentração inicial de NH<sub>3</sub> em torno de 50 mg.L<sup>-1</sup> (0,3 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio). Experimentos controle em nitrato de sódio com concentrações equivalentes de nitrogênio também foram realizados. Dois símbolos do gráfico no mesmo dia representam a concentração de biomassa antes e depois da alimentação por pulso (A); a figura (B) representa o comportamento do pH das culturas ao longo do cultivo e do pH do ensaio controle não inoculado para avaliar a perda de amônia por evaporação.

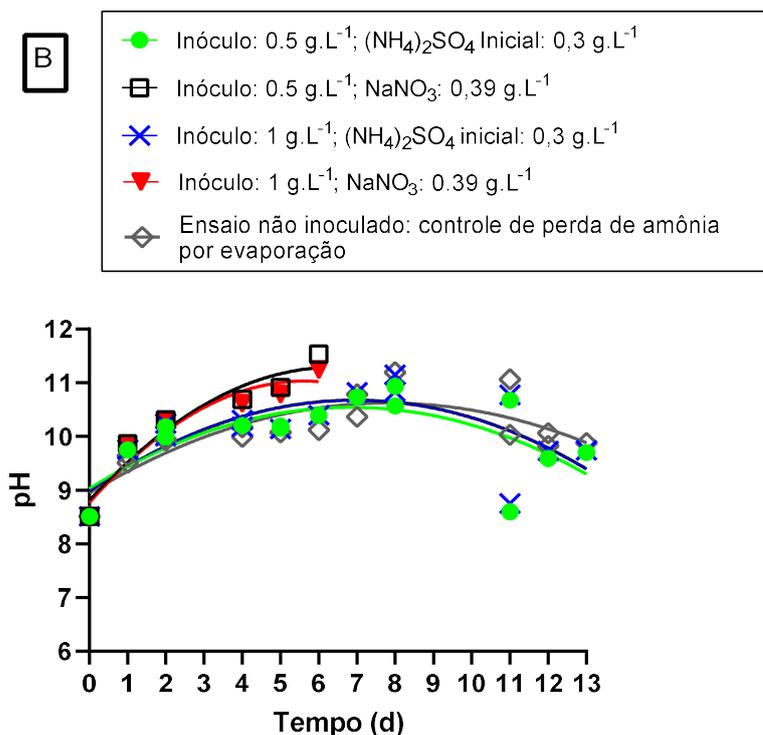
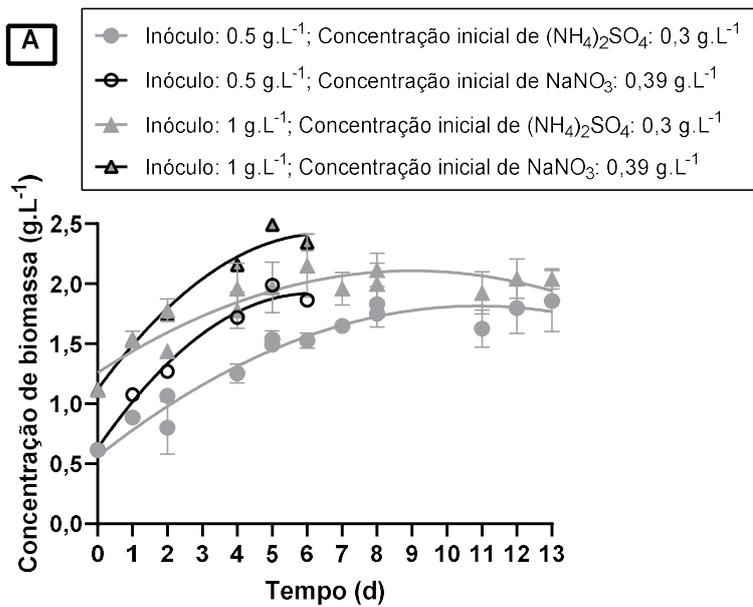


Tabela 4.4 - Parâmetros de produção de *Arthrospira platensis* e de pigmentos (carotenoides e ficocianina) nos experimentos conduzidos por batelada alimentada. Os símbolos de erro representam o desvio padrão. CE (%) é a eficiência de conversão de nitrogênio amoniacal em biomassa de *A. platensis* e EF é a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal.

Fonte: O autor, 2022.

Condições experimentais	Alimentação	Dia	Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	CE (%)
Inóculo: 0.5 g.L <sup>-1</sup> ; NH <sub>3</sub> inicial: 50 mg.L <sup>-1</sup> ; Batelada alimentada		0 ao 2	0,226±0,024	5,73±0,63
	Primeira	2 ao 5	0,193±0,002	14,86±0,22
	Segunda	5 ao 8	0,157±0,014	28,98±4,71
	Terceira	8 ao 13	0,084±0,006	21,28±0,94
			Total de NH <sub>3</sub> removido (mg.L <sup>-1</sup> )	170,2±0,9
			EF (%)	86,27±0,02
			Ficocianina na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	139,09±18,12
			Carotenoides totais na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	1,25±0,06
Condições experimentais	Alimentação	Dia	Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	CE (%)
Inóculo: 1 g.L <sup>-1</sup> ; NH <sub>3</sub> inicial: 50 mg.L <sup>-1</sup> ; Batelada alimentada		0 ao 2	0,331±0,030	7,60±0,05
	Primeira	2 ao 4	0,216±0,062	19,28±3,13
	Segunda	4 ao 8	0,120±0,014	14,15±2,95
	Terceira	8 ao 13	0,072±0,003	20,70±1,09
			Total de NH <sub>3</sub> Removido (mg.L <sup>-1</sup> )	165,1±1,8
			EF (%)	89,97±0,02
			Ficocianina na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	180,52±11,67
			Carotenoides totais na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	1,52±0,11

Fonte: O autor, 2022.

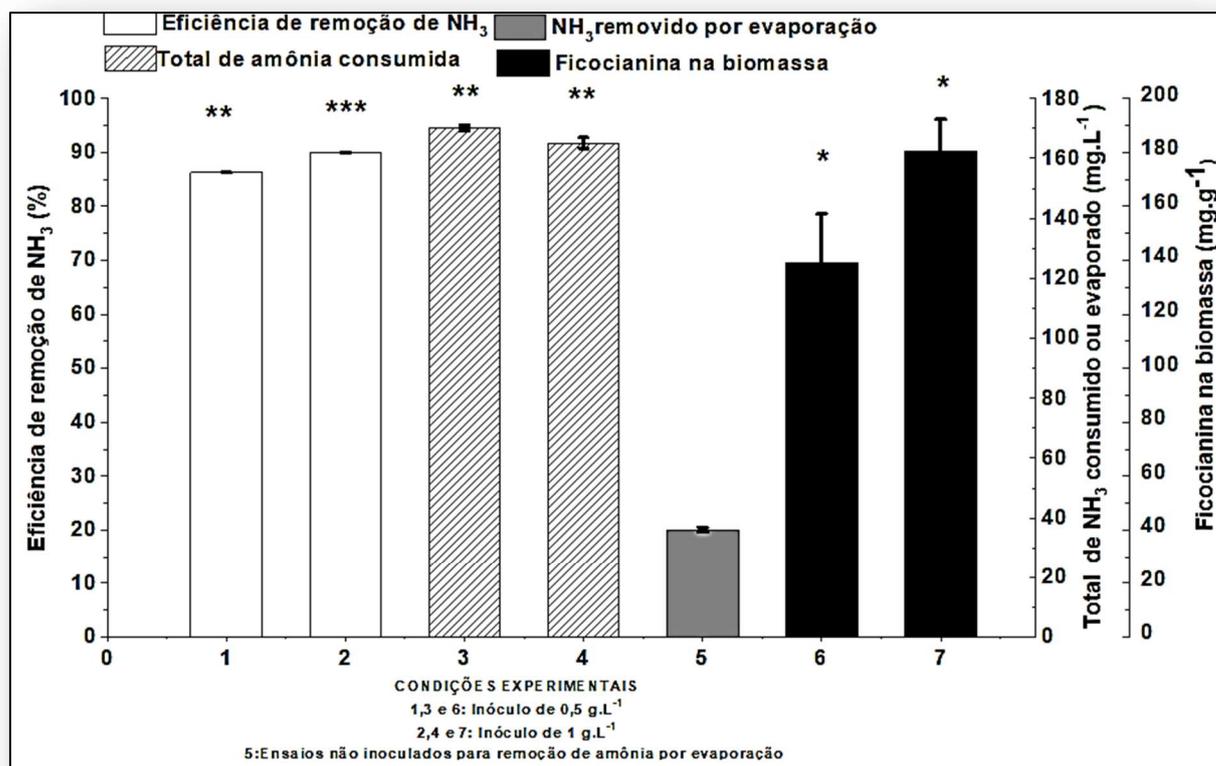
Em relação à comparação da produtividade em biomassa entre os experimentos com diferentes inóculos (0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>), houve diferença estatisticamente significativa apenas durante o início do experimento (até o dia 2), em que a produtividade dos experimentos com 1 g.L<sup>-1</sup> de inóculo foi superior a 0,5 g.L<sup>-1</sup> (0,331±0,030 e 0,226±0,024 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> respectivamente). Do Dia 2 até o final do cultivo, as produtividades em biomassa dessas duas condições avaliadas foram estatisticamente semelhantes (Tabela 4.4).

Portanto, para observar se a diferença entre a diminuição da produtividade em biomassa, no décimo primeiro dia de experimento, foi causada pelos efeitos inibitórios da amônia, em relação ao aumento do pH das culturas, ou pela deficiência nutricional no décimo primeiro dia de cultivo, todos os experimentos foram ajustados ao pH inicial (8,5), visando conter os efeitos inibitórios da amônia. As células permaneceram em fase estacionária até o décimo terceiro dia indicando que, nesse período, poderiam estar sob deficiência nutricional (Gráfico 9).

Com relação ao consumo total de nitrogênio amoniacal ao longo do experimento, os resultados entre as concentrações iniciais de biomassa de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup> não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Gráfico 10). A eficiência de conversão de nitrogênio amoniacal em biomassa de *A. platensis* CE (%) aumentou ao longo das sucessivas alimentações (Tabela 4.4). Ao comparar a CE (%) dos experimentos com inóculo de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>, não houve diferença significativa durante a fase simples, a primeira e a terceira alimentação (Tabela 4.4). Portanto, o consumo total de NH<sub>3</sub> alcançado ao final da terceira alimentação (Gráfico 10), utilizando-se o inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup> foi estatisticamente semelhante ao inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup> (170,2±0,9 e 165,1±1,8 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente). Após 13 dias de cultivo, 36,1±0,8 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub> foram removidos por evaporação.

A estratégia da condução do bioprocessamento por batelada alimentada associada ao inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup> proporcionou o consumo de NH<sub>3</sub> em maiores concentrações (Gráfico 10) quando comparadas a remoção de nitrogênio amoniacal alcançada em batelada simples, em que aproximadamente 78±1,32 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub> foram consumidos. A eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, EF (%), dos experimentos em batelada alimentada foi próxima a 90% (89,97±0,02%, nos experimentos com inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup> e 86,29±0,02% alcançado nos experimentos com inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup>).

Gráfico 10 - Parâmetros dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>. As barras de erro representam o desvio padrão. Os símbolos iguais do mesmo parâmetro analisado indicam que não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados analisados pelo teste de t de Student (alfa de 0,05).



Fonte: O autor, 2022.

Em relação à produção de pigmentos de interesse industrial como os carotenoides totais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os experimentos com inóculo de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup> em meio amoniacal, que tiveram concentrações de carotenoides totais na biomassa de 1,25±0,06 e 1,52 ± 0,11 mg.g<sup>-1</sup> respectivamente, ao final da batelada alimentada. As concentrações de carotenoides totais alcançadas no meio amoniacal e os experimentos controle em 0,39 g.L<sup>-1</sup> de nitrato de sódio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Houve a produção de 1,35±0,02 mg.g<sup>-1</sup> de carotenoides totais na biomassa nos experimentos com concentração inicial de biomassa de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1,21 ± 0,01 mg.g<sup>-1</sup> nos experimentos com concentração inicial de biomassa de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Em relação à produção de ficocianina, observou-se que ambos os inóculos de 0,5 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup> não apresentaram degradação do pigmento ao final do experimento. Antes da primeira

alimentação (ao final da fase simples), em 2 dias de cultivo de *A. platensis*, houve um acúmulo de  $134,07 \pm 0,82 \text{ mg.g}^{-1}$ , em produtividade de  $71,39 \pm 0,44 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , nos experimentos com concentração inicial de biomassa de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  e  $149,50 \pm 2,73 \text{ mg.g}^{-1}$ , em produtividade de  $133,05 \pm 2,43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , nos experimentos com concentração inicial de biomassa de  $1 \text{ g.L}^{-1}$ .

Ao final do experimento, após as alimentações, o acúmulo de  $139,09 \pm 18,12$  e  $180,52 \pm 11,67 \text{ mg.g}^{-1}$  foi alcançado nos experimentos com inóculo de  $0,5$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente (Gráfico 10). Além disso, os acúmulos de ficocianina na biomassa nos experimentos em fonte amoniacal foram superiores aos alcançados pelos experimentos controle em  $0,39 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrato de sódio ( $40,42 \pm 6,05$  e  $72,44 \pm 1,72 \text{ mg.g}^{-1}$  em inóculo de  $0,5$  e  $1 \text{ g.L}^{-1}$  respectivamente).

Ao realizar o bioprocesso para produção de *Arthrospira platensis* SAG 21.99 por batelada alimentada, Markou (2015) atingiu o consumo de aproximadamente  $128 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal (com a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal de 40%) em uma alimentação diária de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ . Essa estratégia permitiu o consumo de maiores concentrações de nitrogênio amoniacal, diminuindo o efeito inibitório da amônia ao inserir essa fonte de nitrogênio periodicamente e em baixas concentrações. Como o aumento do inóculo proporciona vantagens como uma menor perda de amônia por volatilização, além da possibilidade de consumir maiores concentrações de nitrogênio amoniacal (MARKOU, 2015b), a terceira estratégia adotada neste estudo foi conduzir um bioprocesso para remoção do nitrogênio amoniacal por batelada alimentada utilizando um inóculo elevado de *A. platensis*.

Os resultados mostraram que, no metabolismo fotoautotrófico, a concentração inicial de biomassa de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  foi suficiente para atingir a eficiência de remoção próxima a 90% com remoção de  $170,2 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ . O consumo de nitrogênio amoniacal alcançado no presente estudo foi superior aos seguintes estudos relacionados à produção dos gêneros *Spirulina* e *Arthrospira* através da inserção de nitrogênio amoniacal por batelada alimentada: Soletto et al. 2005; Rodrigues et al. 2011; Markou 2015 e Li et al. 2019.

Li et al. (2019) avaliaram a produção de *Spirulina platensis* FACHB-431 inserindo glicose e nitrogênio amoniacal por batelada alimentada. Após o segundo dia de cultivo e em concentrações de aproximadamente  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ , observou-se a queda na produção de biomassa. Este fato pode ser atribuído à baixa concentração do inóculo utilizado ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ), o que interferiu na tolerância da biomassa às elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal, conforme demonstrado no presente estudo.

Posteriormente, Sankaran e Premalatha (2018) também avaliaram a estratégia de aumentar o inóculo em mixotrofia para produzir *Spirulina* sp. em efluentes de digestão anaeróbica. Concentrações iniciais, entre 1 a 5 g.L<sup>-1</sup> de *Spirulina* sp., foram avaliadas. Nesse estudo, houve produção de biomassa com inóculo de 5 g.L<sup>-1</sup>, embora elevadas concentrações iniciais de biomassa pudessem prejudicar a dispersão da luz durante a fotossíntese. Observou-se, também, que concentrações acima de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal não foram letais para esta espécie ao utilizar esta estratégia. Li et al. (2019) mencionam que a mixotrofia também pode ser uma estratégia importante, pois a presença de uma fonte de carbono orgânico pode melhorar a assimilação do nitrogênio amoniacal.

No entanto, ao utilizar essa estratégia, é importante avaliar quais produtos de interesse industrial pretende-se produzir, pois Li et al. (2019) observaram uma diminuição na produção de carotenoides com a inserção de uma fonte de carbono orgânico. Eles mencionaram que a disponibilidade de uma fonte de carbono faz com que não haja uma dependência direta do aparato fotossintetizante da biomassa. Com isso, a concentração dos pigmentos fotossintetizantes é diminuída em comparação às concentrações alcançadas em cultivo fotoautotrófico (LI et al., 2019). Por outro lado, a mixotrofia pode favorecer a produção de compostos de reserva energética, como lipídios e polihidroxicarboxilatos (SINGH et al., 2017; LI et al. 2019).

Além disso, houve o questionamento, nesta etapa do presente estudo, se em metabolismo mixotrófico, em que há mais independência da fotossíntese, a cianobactéria seria menos afetada pela menor dispersão da luz devido às elevadas concentrações de biomassa. Dessa forma, em mixotrofia e com a otimização da concentração dos componentes do meio, questionou-se quanto a possibilidade de se observar um aumento no consumo de NH<sub>3</sub> utilizando concentrações de inóculo superiores a 0,5 g.L<sup>-1</sup>.

A maior eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal observada no presente estudo, em comparação a Markou (2015), pode ser atribuída ao aumento do pH ao longo do cultivo. Além disso, outro fator relacionado pode ser a perda de amônia por evaporação no fotobiorreator aerado utilizado em Markou (2015), bem como as menores concentrações de nutrientes como o fósforo presentes no efluente avaliado no estudo citado. Estudos que visam compreender as necessidades nutricionais das cianobactérias em meios definidos são muito importantes para definir estratégias satisfatórias para suplementação de efluentes.

Este estudo relatou que a maior produtividade em biomassa em fontes amoniacais pode estar relacionada à disponibilidade de nutrientes em autotrofia. No início do cultivo, quando há maior disponibilidade de nutrientes, observou-se uma maior produtividade em biomassa nos

experimentos com maior inóculo ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) em relação aos experimentos com menor inóculo ( $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ). Posteriormente, no décimo primeiro dia de cultivo, quando o pH dos experimentos foi ajustado para 8,5 para conter os efeitos da toxicidade do  $\text{NH}_3$ , observou-se que a fase estacionária foi mantida, não sendo observado o crescimento adicional. Provavelmente, a privação nutricional limitou o crescimento da cianobactéria e uma otimização das concentrações da solução de alimentação seja necessária.

Além da condução do bioprocesso por batelada alimentada ser uma estratégia que permite o consumo de maiores concentrações de nitrogênio amoniacal, esse modo de condução também pode reduzir significativamente o custo com o meio de produção em comparação à batelada simples (SONEGO et al., 2018). Para remoção de  $170 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal obtida em batelada alimentada neste estudo, seriam necessários mais de dois bioprocessos em batelada simples de acordo com os resultados do presente estudo. Considerando os resultados do presente estudo, dois bioprocessos em batelada simples removeriam aproximadamente  $156 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal. Considerando também o volume útil de 1L, o custo dos nutrientes que compõem o meio de produção (exceto a fonte de nitrogênio que estaria disponível no efluente) corresponderia a aproximadamente R\$ 14,60 em batelada simples. Ao realizar o bioprocesso por batelada alimentada o custo com o meio de produção corresponderia a um total de R\$ 9,84. Levou-se em consideração o custo dos componentes do meio da fase simples e das soluções de alimentação acidificadas no bioprocesso conduzido por batelada alimentada. Para o cálculo, considerou-se os valores dos reagentes em padrão analítico. Obteve-se uma redução de custo com o meio de produção de 33% ao conduzir o bioprocesso por batelada alimentada.

Em relação ao uso biotecnológico das cianobactérias produzidas a partir de fontes amoniacais, embora haja produção satisfatória de pigmentos proteicos, existem questões regulatórias e legislativas sobre sua aplicação na indústria alimentícia. Mesmo assim, o alto teor de pigmentos proteicos, como a ficocianina, torna a biomassa rica em nitrogênio, além de fósforo, podendo ser utilizada como fertilizante sustentável de liberação lenta, segundo Manirafasha et al. (2018) e Koutra et al. (2017). Além disso, Patel (2011) relata o crescente interesse na utilização de corantes naturais em outros setores da indústria, como no setor têxtil ou na fabricação de tintas para diversas aplicações, uma vez que os corantes sintéticos não são biodegradáveis e podem afetar o meio ambiente e a saúde humana.

Como a ficocianina é um pigmento protéico e devido à grande disponibilidade de nitrogênio nos experimentos em batelada alimentada, optou-se por avaliar a produção deste pigmento na biomassa produzida. Um teor de  $180,52 \pm 11,67 \text{ mg.g}^{-1}$  foi alcançado nos

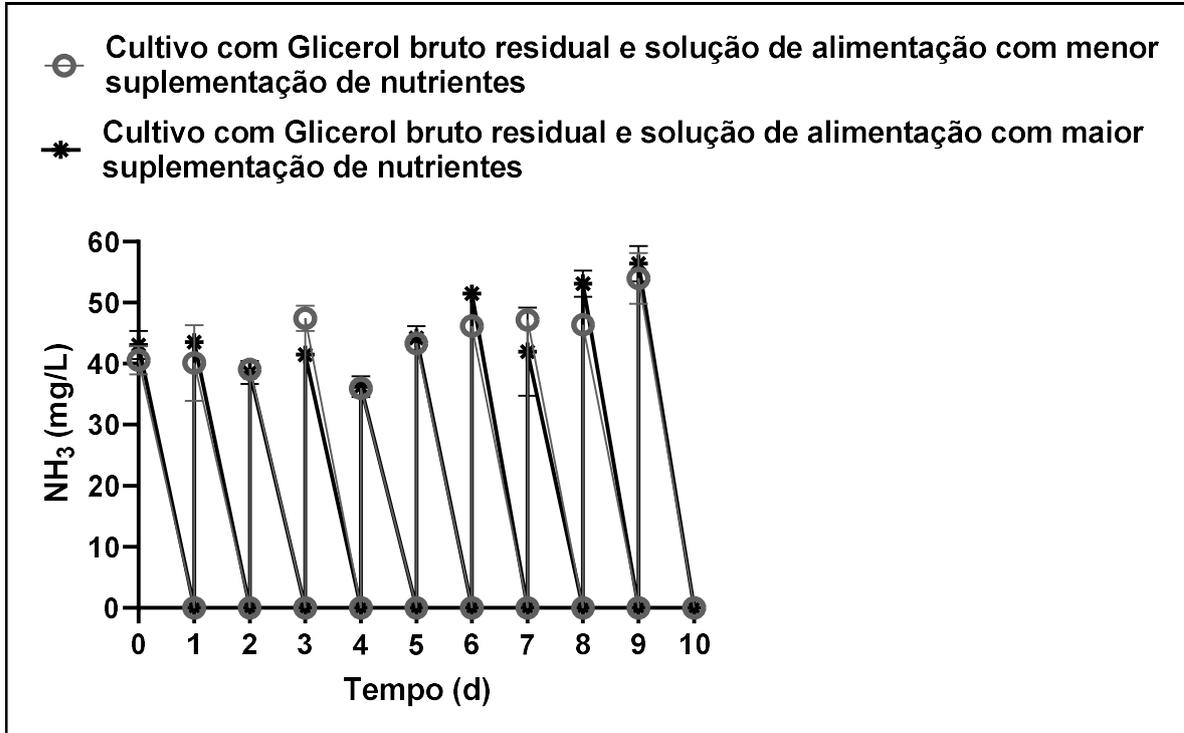
experimentos com  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de inóculo em comparação com alguns estudos citados a seguir. Álvarez e Otero (2020) avaliaram a produção de ficocianina por *Arthrospira* sp. usando efluentes industriais contendo nitrogênio amoniacal e alcançou  $87,1 \pm 7,1 \text{ mg.g}^{-1}$  de ficocianina na biomassa cultivada no meio de Zarrouk e  $73,7 \pm 7,7 \text{ mg.g}^{-1}$  na biomassa cultivada nos efluentes industriais. Manirafasha et al. (2018) relataram a produção de  $56,536 \pm 0,184 \text{ mg.g}^{-1}$  de ficocianina por *Arthrospira platensis* cultivada sob a adição de glutamato e com a inserção de nitrato como fonte de nitrogênio por batelada alimentada.

Assim, observou-se, neste estudo, que aliar a estratégia do aumento do inóculo de 0,2 para  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  à condução do cultivo por batelada levou a um aumento tanto da concentração de nitrogênio amoniacal consumido (em eficiência próxima a 90 %), mas, também, na produção potencial de pigmentos de interesse industrial como a ficocianina. Tais conclusões, até então, possibilitaram o desenvolvimento das etapas seguintes do presente estudo, que teve por objetivo avaliar a sinergia entre o aumento do inóculo, a condução do bioprocesso por batelada alimentada e a mixotrofia. A mixotrofia tem se mostrado uma estratégia promissora, conforme os exemplos de estudos citados, tanto para o aumento da assimilação do nitrogênio amoniacal quanto para produção de compostos de reserva energética, como os biopolímeros (polihidroxialcanoatos), pelas cianobactérias.

#### **4.4 Avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial**

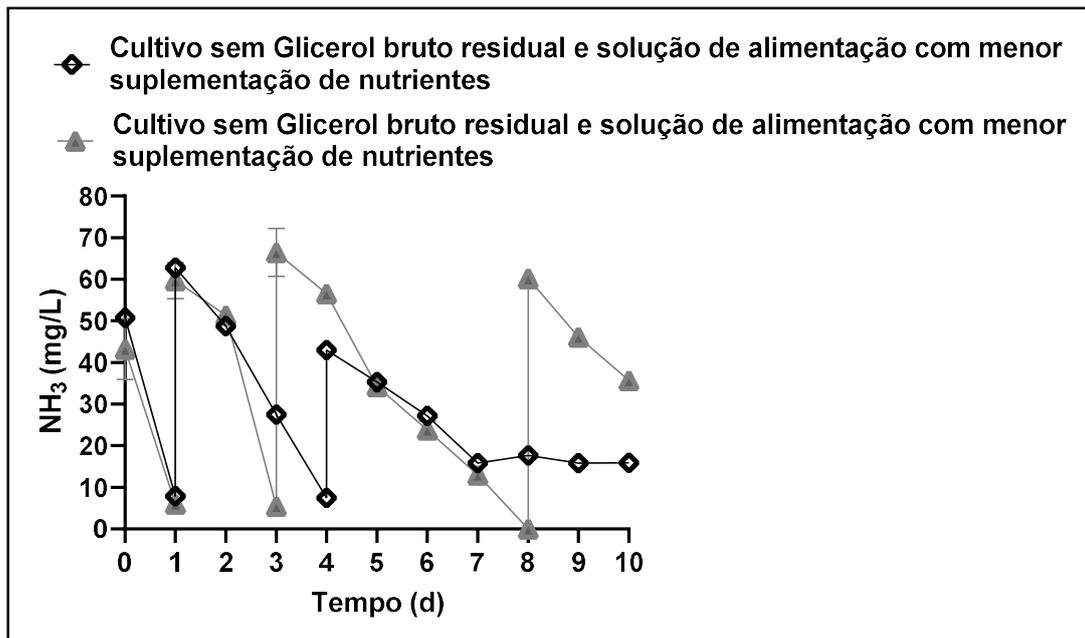
Os perfis de consumo de nitrogênio amoniacal pelos micro-organismos cultivados nos experimentos dessa fase do estudo podem ser observados nos Gráficos 11 e 12. A inserção de glicerol bruto residual aumentou significativamente a taxa de assimilação em ambas as condições avaliadas (com baixa e alta suplementação de nutrientes), consumindo  $40\text{-}50 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal diariamente (Gráfico 11). Ao observar os experimentos sem glicerol bruto residual (Gráfico 12), observa-se um consumo mais lento, em função dos efeitos inibitórios do nitrogênio amoniacal. Após 10 dias de cultivo, os bioprocessos com glicerol bruto ainda se mantiveram estáveis, havendo um consumo diário total do nitrogênio amoniacal adicionado nos experimentos.

Gráfico 11 – Perfil de consumo de nitrogênio amoniacal por *A. platensis* nos experimentos com glicerol bruto residual em batelada alimentada.



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 12 – Perfil de consumo de nitrogênio amoniacal por *A. platensis* nos experimentos sem glicerol bruto residual em batelada alimentada.



Fonte: O autor, 2022.

Houve um consumo total estatisticamente semelhante ( $411\pm 2$  e  $421,1\pm 8$   $\text{mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal), com eficiência de remoção de 100 %, nos experimentos com glicerol bruto residual, conduzidos por batelada alimentada, com soluções de alimentação contendo menor e maior suplementação de nutrientes, respectivamente (Tabela 4.5). O aspecto das culturas nessas condições ao final do experimento também foi semelhante (Figura 21). Houve diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4.5) entre esses resultados em relação ao consumo total de nitrogênio amoniacal alcançado pelos experimentos sem glicerol bruto residual ( $106\pm 2$  e  $159\pm 8$   $\text{mg.L}^{-1}$  de nitrogênio amoniacal).

Em relação à produção de biomassa, o crescimento simultâneo de bactérias heterotróficas e cianobactérias prejudicou o monitoramento diário do crescimento por espectrofotometria visível. Além disso, o monitoramento diário da produção de biomassa por massa seca foi inviável devido ao pequeno volume útil dos frascos agitados. Embora sucessivas alimentações, com soluções contendo nutrientes e nitrogênio amoniacal, tenham aumentado o volume final do sistema e, portanto, diminuído a concentração final de biomassa, a concentração final de *A. platensis*, Tabela 4.5, nos experimentos com glicerol bruto residual ( $3,43\pm 0,38$  e  $4,27\pm 0,43$   $\text{g.L}^{-1}$ ), com alta produtividade de biomassa ( $0,198\pm 0,04$  e  $0,283\pm 0,045$   $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), foi superior aos experimentos sem esta fonte orgânica ( $1,55\pm 0,05$  e  $2,28\pm 0,13$   $\text{g.L}^{-1}$ ).

A diferença na suplementação de nutrientes não influenciou à concentração final de biomassa (Tabela 4.5). Embora o bioprocessamento com glicerol bruto residual tenha começado com uma elevada concentração inicial de *A. platensis* (próxima a  $1,4$   $\text{g.L}^{-1}$ ) para conter o efeito inibitório do nitrogênio amoniacal, com a massa inicial de  $0,225$  g, houve um aumento de massa de  $0,86\pm 0,12$  e  $1,1\pm 0,14$  g nos experimentos alimentados com menor e maior suplementação de nutrientes, respectivamente. Houve, portanto, um aumento de quatro vezes, aproximadamente, da massa inicial necessária para o bioprocessamento.

Para buscar respostas que explicassem a maior produção de biomassa e assimilação de nitrogênio amoniacal nos experimentos com glicerol bruto residual, analisou-se o pH ao longo do cultivo. O pH final das culturas com glicerol bruto residual foi significativamente menor (aproximadamente 9,2) quando comparado ao pH dos experimentos sem glicerol bruto residual (aproximadamente 10,7) e os experimentos controle com nitrato de sódio (aproximadamente 10,5). É possível observar, na Tabela 4.5, a presença de bactérias heterotróficas, que atingiram a concentração final de aproximadamente  $1$   $\text{g.L}^{-1}$ , nos experimentos com glicerol bruto residual.



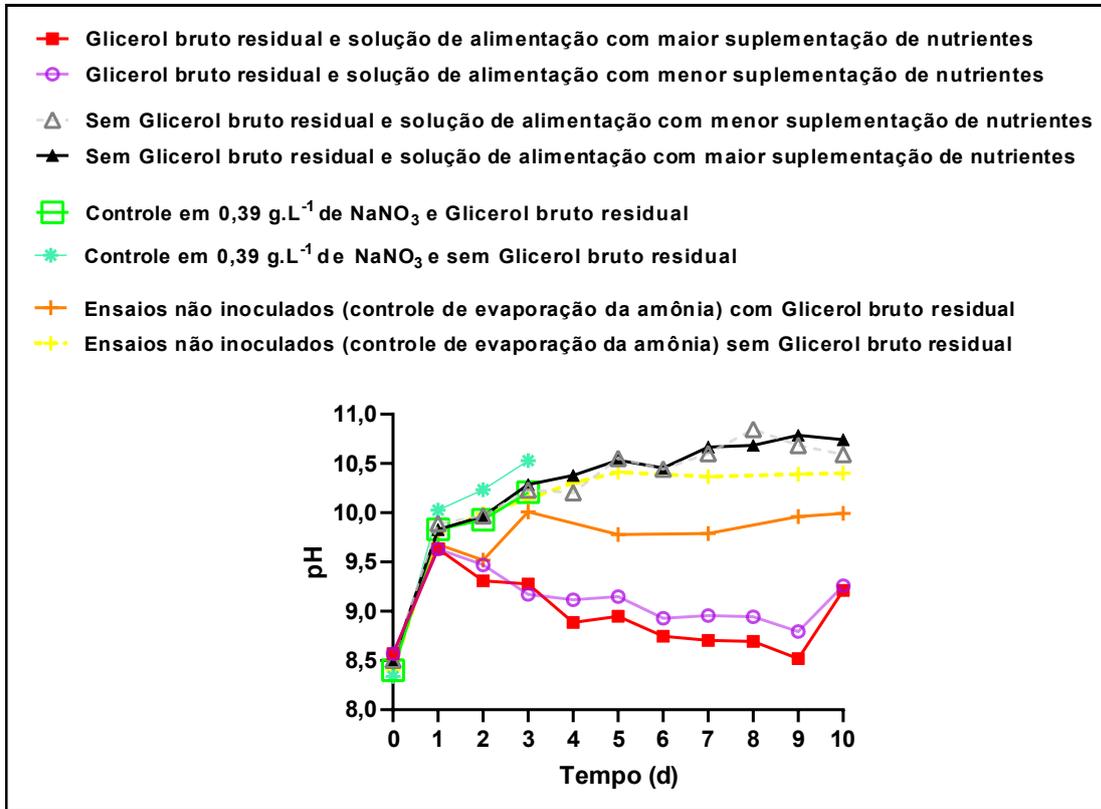
---

<b>Ensaio não inoculado sem Glicerol bruto residual</b>	34.3±0.4 d
---	------------

---

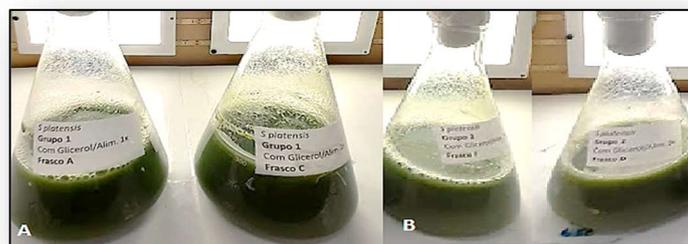
Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 13 – Acompanhamento do pH ao longo do cultivo dos experimentos com *A. platensis* conduzidos por batelada alimentada com e sem Glicerol bruto residual e em diferentes soluções de alimentação



Fonte: O autor, 2022.

Figura 21 – Aspecto dos experimentos ao fim do cultivo misto de *A. platensis* e bactérias heterotróficas em glicerol bruto residual e fonte amoniacal.



Legenda: A representa os experimentos alimentados com soluções contendo menores concentrações de nutrientes e B os experimentos alimentados com soluções contendo maiores concentrações de nutrientes.

Fonte: O autor, 2022.

A maior produtividade em biomassa e assimilação de nitrogênio amoniacal em presença de glicerol bruto residual pode ser explicada por essa condição ter proporcionado um pH mais baixo, o que provavelmente permitiu uma menor prevalência de amônia no balanço entre amônia e amônio. Isso reduz a toxicidade do sistema, permitindo uma alta assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de biomassa (SALBITANI; CARFAGNA, 2021). Em seguida, buscou-se responder por que a presença dessa fonte de carbono orgânico diminuiu o pH do sistema.

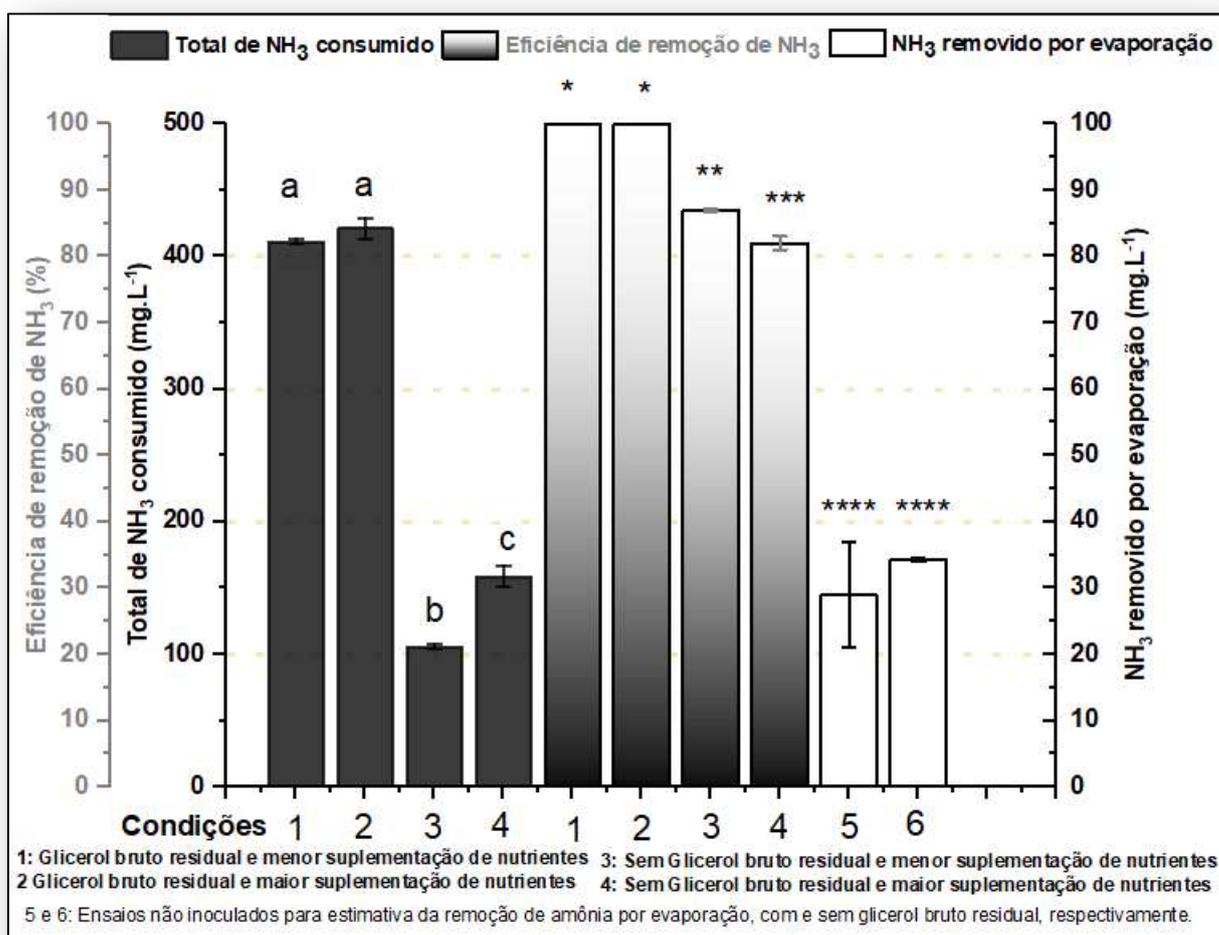
A primeira possibilidade é que em culturas autotróficas, sem o glicerol bruto residual, as cianobactérias tendem a consumir abundantemente carbonato como fonte de carbono inorgânico, cujas reações resultam no aumento do pH da cultura. Além de aumentar a prevalência de amônia e a toxicidade, quando o pH atinge valores superiores a 11, o equilíbrio entre carbonato e bicarbonato é afetado, diminuindo a disponibilidade de bicarbonato, que é a fonte de carbono inorgânico mais facilmente assimilável pelas microalgas e cianobactérias (POURJAMSHIDIAN et al., 2019; SALBITANI; CARFAGNA, 2021). Essas circunstâncias podem estar relacionadas à menor produção de biomassa nos experimentos em autotrofia, sem o glicerol bruto residual.

Quando há uma fonte de carbono orgânico na cultura como o glicerol, que é reconhecidamente um composto osmoprotetor (RAYMOND; MORGAN-KISS; STAHL-ROMMEL, 2020), e em mixotrofia, o consumo de bicarbonato é menor e mais lento, impedindo o rápido aumento do pH do sistema (SALBITANI; CARFAGNA, 2021). A outra hipótese é a produção de compostos ácidos que diminuíram o pH da cultura pelas bactérias heterotróficas, que só cresceram significativamente na presença do glicerol bruto residual. Esta hipótese pode ser um exemplo dos efeitos benéficos dessa cultura mista no bioprocessamento desenvolvido.

O pH dos experimentos deste estudo foi controlado através da inserção na cultura de soluções ácidas contendo nitrogênio amoniacal e nutrientes, na condução do bioprocessamento por batelada alimentada. O pH estável e baixo nas culturas com glicerol bruto residual sugere que pode não haver a necessidade do controle de pH por meio de soluções ácidas, o que reduz a complexidade e o custo do bioprocessamento. Os resultados anteriores do presente estudo mostraram como a condução do bioprocessamento por batelada alimentada reduz significativamente o custo do meio de cultura em comparação à batelada simples. Além disso, diante da análise da Tabela 4.5, os experimentos com maior disponibilidade de nutrientes foram comparados aos com menor suplementação de nutrientes. Ambos apresentaram resultados semelhantes, o que indica, comparando as duas condições com baixa e alta suplementação de nutrientes avaliadas, que as

menores concentrações de nutrientes podem ser utilizadas para alimentar este sistema, o que sugere um menor custo com o meio de produção (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos com *A. platensis* conduzidos por batelada alimentada com e sem Glicerol bruto residual e em diferentes soluções de alimentação

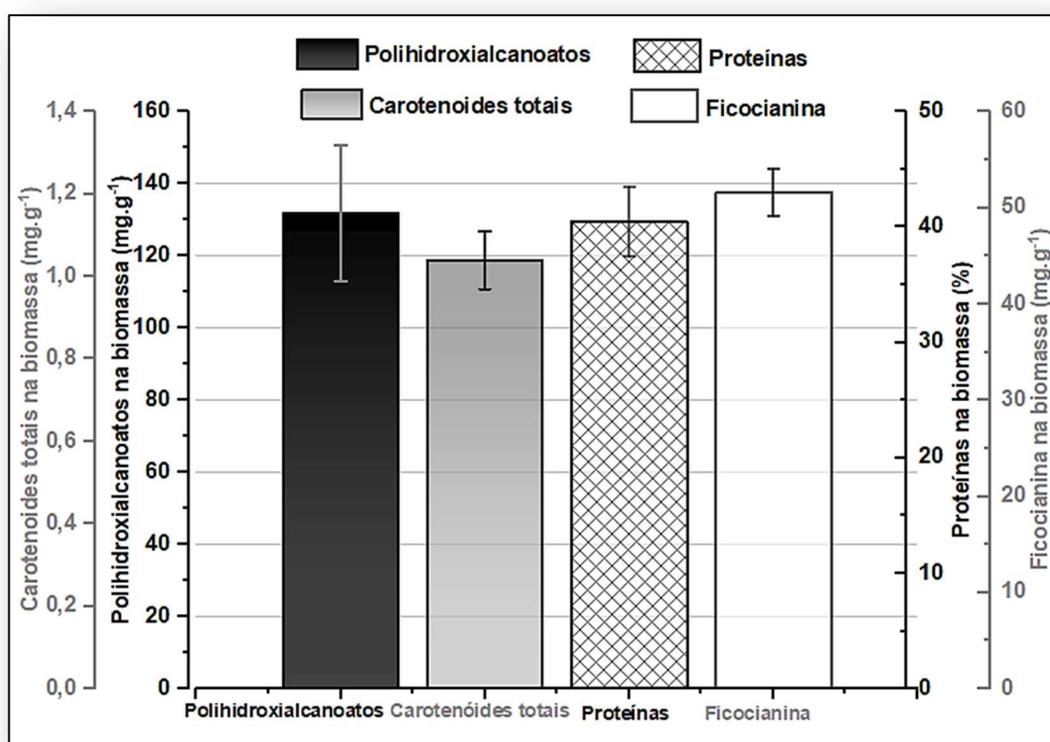


Fonte: O autor, 2022.

Como os experimentos desta fase do estudo foram realizados em frascos agitados e devido ao seu pequeno volume útil, toda a biomassa foi recuperada por centrifugação para a análise de produtos de interesse industrial, havendo, portanto, uma mistura de bactérias heterotróficas e cianobactérias na biomassa analisada. Provavelmente, se a recuperação de cianobactérias e bactérias heterotróficas fossem separadas, com uma biomassa mais pura, a

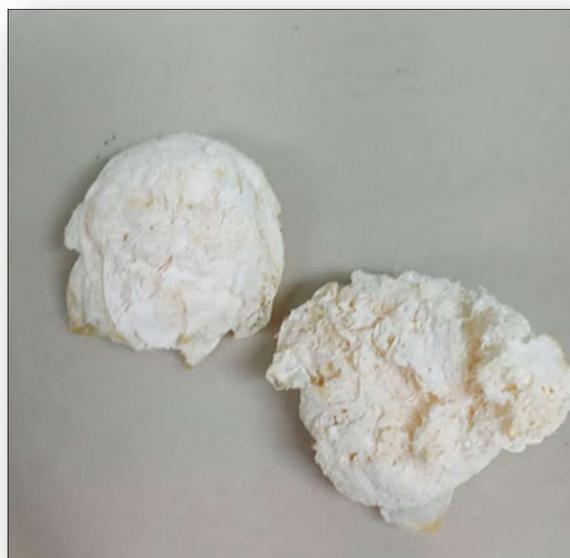
concentração de compostos de interesse industrial poderia ser ainda maior. Os compostos de interesse industrial produzidos podem ser observados na Tabela 4.5 e no Gráfico 15. A produção de ficocianina foi maior nos experimentos com menor suplementação de nutrientes e com adição de glicerol bruto residual ( $51,6 \pm 2,4 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Houve uma diminuição na produção desse pigmento devido à inserção de glicerol bruto residual, uma vez que a maior produção foi de  $116 \pm 4 \text{ mg.g}^{-1}$  no ensaio sem glicerol bruto residual. Por outro lado, nos experimentos com glicerol bruto residual houve produção de compostos de reserva energética como os polihidroxicanoatos (precursores da produção de plástico biodegradável), com produção de  $132 \pm 19 \text{ mg.g}^{-1}$  na biomassa cultivada com menor suplementação de nutrientes (Gráfico 15 e Figura 22).

Gráfico 15 – Produtos de interesse industrial produzidos por *A. platensis* e bactérias heterotróficas durante o experimento para remoção de nitrogênio amoniacal, em batelada alimentada, com glicerol bruto residual e solução de alimentação contendo menores concentrações de nutrientes.



Fonte: O autor, 2022.

Figura 22 - Biopolímeros secos e extraídos da biomassa produzida durante o bioprocesso em glicerol bruto residual e menor suplementação de nutrientes para assimilação de nitrogênio amoniacal



Fonte: O autor, 2022.

Em relação ao percentual de proteínas, a biomassa cultivada em glicerol bruto residual com menor suplementação de nutrientes apresentou  $40\pm 3\%$ . Os Ensaio sem glicerol bruto residual apresentaram maior porcentagem em proteínas. No entanto, como houve maior produção de biomassa cultivada em glicerol bruto residual, ao analisar a concentração de proteínas na cultura, o resultado foi equacionado com  $1,9\pm 0,04$  e  $1,24 \text{ g.L}^{-1}$  de proteínas (nos ensaios com glicerol bruto residual contendo baixa e alta suplementação de nutrientes respectivamente) e  $1,24\pm 0,01$  e  $1,05\pm 0,001 \text{ g.L}^{-1}$  em ensaios sem glicerol bruto residual (contendo baixa e alta suplementação de nutrientes, respectivamente).

Por alguns fatores como a produção de compostos de interesse industrial (Gráfico 15) e pela maior assimilação de nitrogênio amoniacal, considerou-se a condição dos experimentos com glicerol bruto residual e com menor suplementação de nutrientes como a mais atrativa para proceder a fase seguinte do presente estudo. Na fase seguinte, investigou-se houve o consumo de glicerol a partir do glicerol bruto residual nesta condição e se houve produção de nitrito e nitrato como intermediários pelas bactérias heterotróficas.

O objetivo, da fase seguinte do estudo, foi cultivar os micro-organismos em maior volume útil para obter a cinética de crescimento de bactérias heterotróficas e de *A. platensis*. O principal questionamento, até então, foi buscar respostas acerca de quem produziu os

biopolímeros, já que pode ter sido produzido principalmente por *A. platensis* ou pelas bactérias heterotróficas.

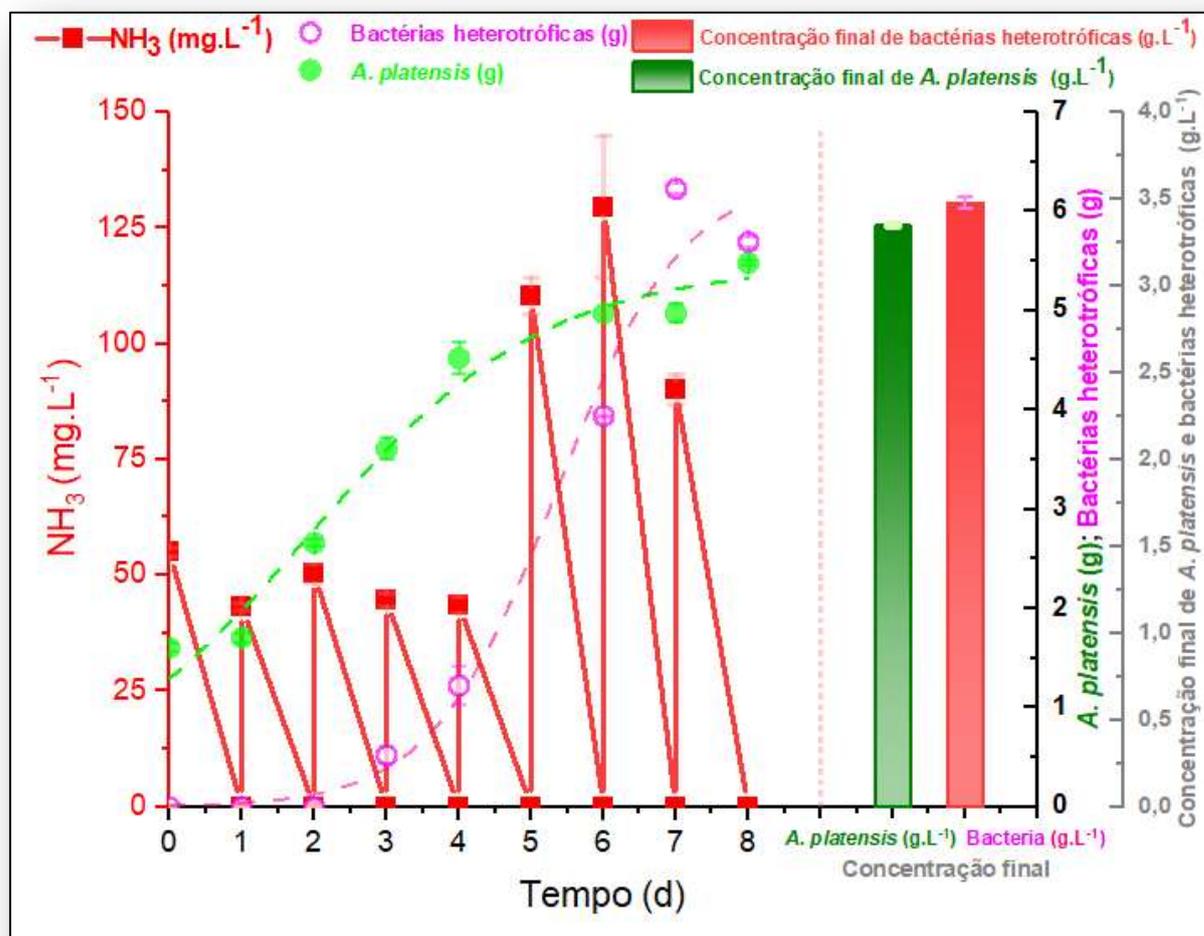
#### **4.5 Avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual: experimentos em garrafas de 5 L**

No Gráfico 16 pode-se observar a cinética de produção de biomassa e o perfil de consumo de nitrogênio amoniacal da cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas. Como o bioprocesso foi operado em batelada alimentada, havendo a variação constante no volume do sistema e, conseqüentemente, na concentração de biomassa a cada alimentação do nitrogênio amoniacal e de glicerol bruto residual, os resultados de crescimento também foram expressos na massa de *A. platensis* (g) e bactérias heterotróficas (g).

Os resultados expressos no Gráfico 16 indicam o rápido crescimento de *A. platensis* até o quarto dia de crescimento ( $4,53 \pm 0,16$  g;  $3,28 \pm 0,11$  g.L<sup>-1</sup>), totalizando, no sistema, a produção de  $5,75 \pm 0,04$  g de biomassa entre *A. platensis* e bactérias heterotróficas. Até esse momento, a taxa diária de alimentação e consumo de nitrogênio amoniacal foi próxima a 50 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Devido à elevada produção inicial de biomassa e para evitar a limitação de nitrogênio no sistema, optou-se por aumentar a concentração diária de nitrogênio amoniacal para valores próximos a 100 mg.L<sup>-1</sup>. Surpreendentemente, houve consumo diário total dessa concentração de nitrogênio amoniacal.

Entre o quarto e o sétimo dia, houve o crescimento expressivo de bactérias heterotróficas, chegando a  $6,23 \pm 0,05$  g ( $3,81 \pm 0,03$  g.L<sup>-1</sup>) no sétimo dia. No entanto, observou-se uma tendência à fase estacionária de crescimento de *A. platensis* entre 6 e 8 dias, atingindo  $5,48 \pm 0,02$  g ( $3,35 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup>) no oitavo dia. Suspeitou-se do predomínio de bactérias heterotróficas afetar o consumo de glicerol por *A. platensis* e prejudicar a produção de biopolímeros e, por isso, o bioprocesso foi interrompido no oitavo dia. O bioprocesso foi interrompido ainda que, aparentemente, as bactérias heterotróficas não tenham atingido a fase estacionária por ainda haver um consumo diário total próximo a 100 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal.

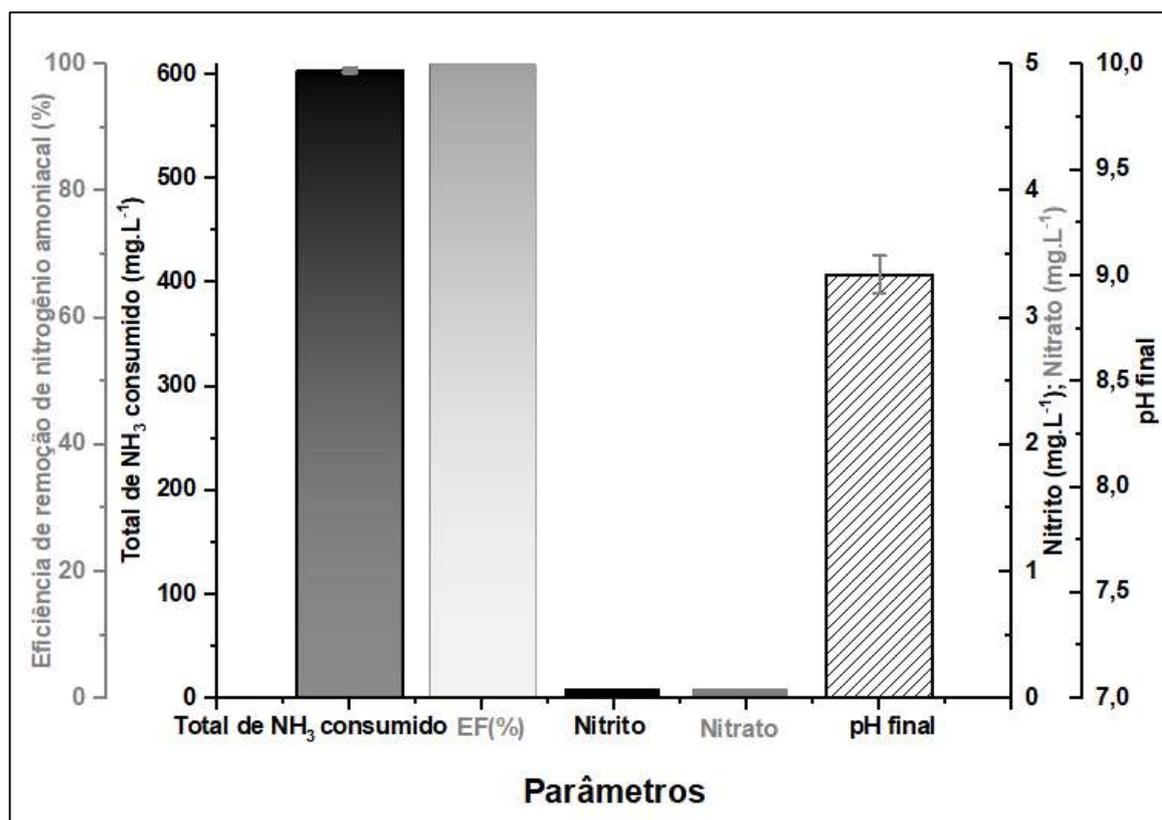
Gráfico 16 – Perfil de crescimento e consumo de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de *A. platensis* e bactérias heterotróficas em batelada alimentada e com Glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

Ainda assim, o resultado da análise C:H:N da biomassa mista liofilizada de *A. platensis* e bactérias heterotróficas mostrou um percentual de nitrogênio na biomassa de 9,3%, o que sugere um elevado consumo de  $604 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$  pela biomassa total produzida por *A. platensis* e bactérias heterotróficas. Diante disso, considerou-se a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal como 100% nesta condição, baseando-se em toda concentração de nitrogênio amoniacal alimentado no sistema. Esse consumo total poderia ser ainda maior se o bioprocessamento não fosse interrompido. A análise do Gráfico 17 também indica o baixo pH final da cultura, em torno de 9, e a ausência de nitrato e nitrito no meio de cultura, possíveis intermediários produzidos pelas bactérias heterotróficas.

Gráfico 17 – Assimilação de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de *A. platensis* e bactérias heterotróficas e avaliação da presença de nitrito e nitrato como intermediários no bioprocesso conduzido por batelada alimentada em presença de Glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

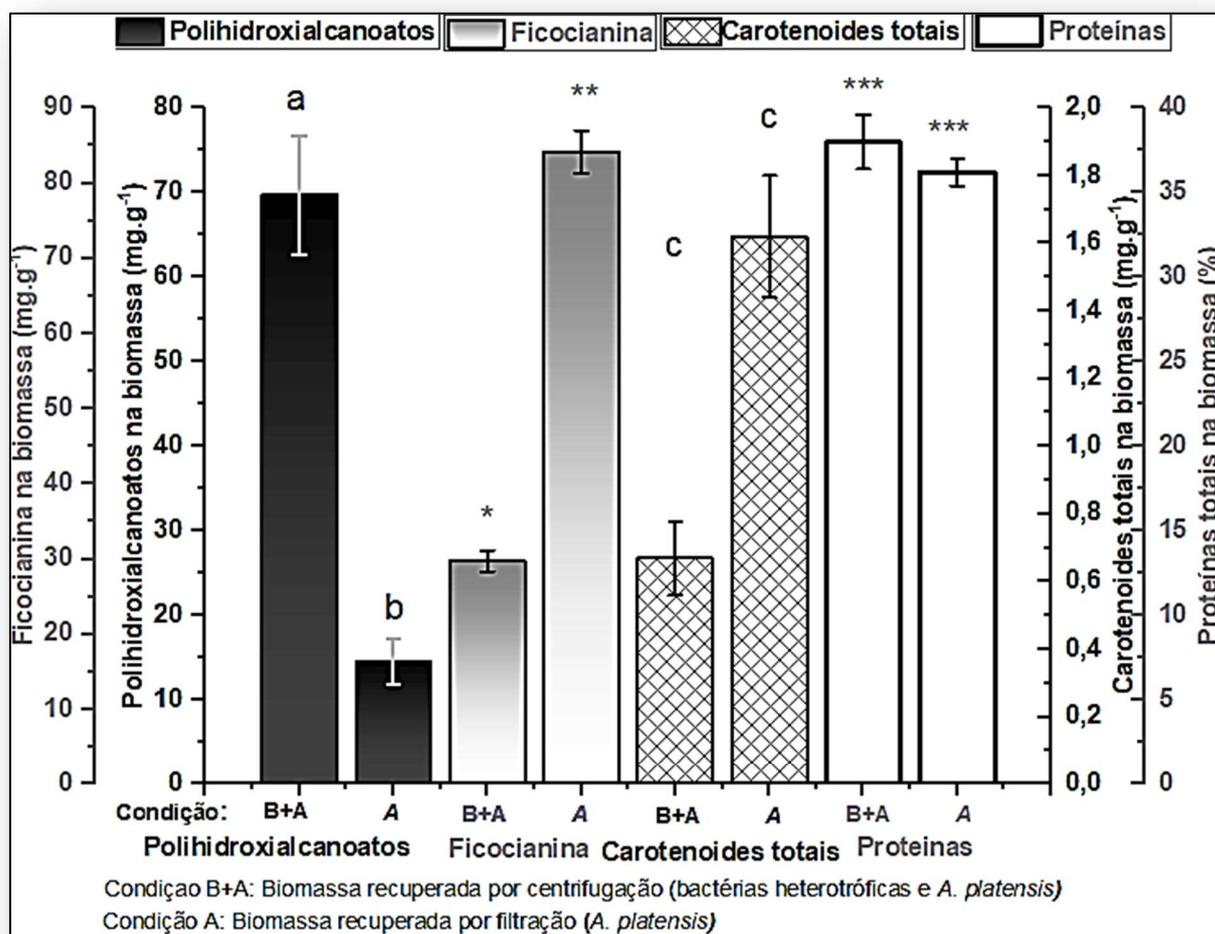
Para avaliar a produção de compostos de interesse industrial neste bioprocesso, parte do volume da cultura foi utilizada para recuperar apenas *A. platensis*, realizando o processo de filtração em membrana com porosidade de 0,7  $\mu\text{m}$ , na qual sua porosidade retém apenas as cianobactérias devido ao seu maior diâmetro. A produção de compostos a partir dessa biomassa foi comparada à biomassa recuperada por centrifugação, composta tanto pela biomassa de *A. platensis* quanto por bactérias heterotróficas. Surpreendentemente, observamos que houve uma produção majoritária de polihidroxicanoatos, que são os biopolímeros precursores da produção de plásticos biodegradáveis, pelas bactérias heterotróficas. A biomassa contendo bactérias heterotróficas e *A. platensis* era composta por  $70 \pm 7 \text{ mg.g}^{-1}$  de polihidroxicanoatos na biomassa, enquanto a biomassa contendo apenas *A. platensis* apresentou  $15 \pm 2 \text{ mg.g}^{-1}$  desses biopolímeros. Tal diferença é estatisticamente significativa (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Principais resultados do bioprocesso desenvolvido para assimilação de nitrogênio amoniacal pelo cultivo misto de *A. platensis* e bactérias heterotróficas e compostos de interesse industrial produzidos. Onde X é a concentração final de células; Qx a produtividade volumétrica em biomassa e EF é a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal. Letras diferentes nos dados comparados de um parâmetro representa diferença estatisticamente significativa entre os dados. Resultados obtidos após 8d de cultivo.

Condições experimentais	Total de NH <sub>3</sub> consumido (mg.L <sup>-1</sup> )	EF (%)	Glicerol consumido (g.L <sup>-1</sup> )	<i>A. platensis</i> (X: g.L <sup>-1</sup> )	<i>A. platensis</i> Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Bactérias heterotróficas (X: g.L <sup>-1</sup> )	Bactérias heterotróficas (Qx:g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
Cultura mista de <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas por batelada alimentada em meio amoniacal e glicerol bruto residual (volume útil inicial: 1L)	604±2	100±0	10,74±0,1	3,35±0,01	0,226±0,005	3,48±0,02	0,435±0,004
<b>Produção de compostos de interesse industrial</b>							
Condições experimentais	Ficocianina na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	Ficocinina na cultura (mg.L <sup>-1</sup> )	Carotenoides totais na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )	Proteínas totais (%)	PHA na biomassa (mg.g <sup>-1</sup> )		
Biomassa recuperada por centrifugação ( <i>A. platensis</i> e bactérias heterotróficas)	29,7±1,4 a	104±5 b	0,67±0,11 a	37,6±2,0 a	70±7 a		
Biomassa recuperada por filtração ( <i>A. platensis</i> )	84,2±2,8 b	282±10 a	1,62±0,18 b	36±1 a	15±2 b		
<b>Produção de PHA em experimento controle conduzido por batelada sequencial em autotrofia e em meio Zarrouk com nitrato de sódio</b>							
<i>A. platensis</i> (X: g.L <sup>-1</sup> )	1,13±0,02	Crescimento de bactérias heterotróficas: não identificado	<i>A. platensis</i> Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	0,047±0,005	PHA (mg.g <sup>-1</sup> )	14,9±3,5	

Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 18 – Compostos de interesse industrial produzidos por *A. platensis* e bactérias heterotróficas durante o bioprocesso desenvolvido para o aumento da assimilação de nitrogênio amoniacal em presença de Glicerol bruto residual



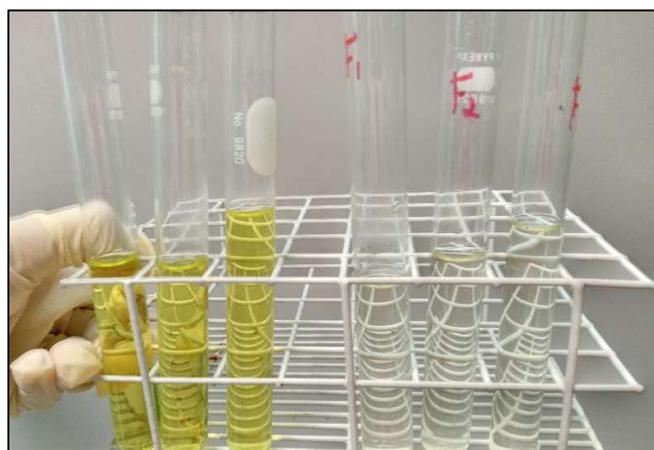
Fonte: O autor, 2022.

Um comportamento distinto é observado durante a análise dos pigmentos. A biomassa contendo apenas *A. platensis* foi composta por  $84,2 \pm 2,8$  mg.g<sup>-1</sup> de ficocianina na biomassa, embora o metabolismo mixotrófico tenda a diminuir a concentração desse pigmento. Esse acúmulo de ficocianina foi maior quando comparado ao obtido na biomassa mista (Tabela 4.6). Os dois tipos de biomassa analisadas apresentaram percentuais estatisticamente semelhantes de proteínas na biomassa ( $38 \pm 2\%$ , na biomassa contendo *A. platensis* e  $36 \pm 1\%$ , biomassa mista).

Isso sugere que o processo de filtração foi uma forma eficiente de separar as biomassas produzidas para sua aplicação em diferentes finalidades e a aplicação biotecnológica de toda biomassa produzida. Em relação ao consumo de glicerol bruto residual de biodiesel, nossa

análise mostrou que em  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol bruto residual utilizado havia  $3,58 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol. Alimentações por pulso de  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol bruto residual foram realizadas a cada 2 dias de cultivo, totalizando 3 alimentações. Não houve glicerol no meio de cultura após 8 dias de cultivo (Figura 23) e, portanto, assumimos que todo o glicerol disponível foi consumido ( $10,74 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol em  $18 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol bruto residual do biodiesel utilizado). Ressalta-se, também, que os produtos de interesse industrial produzidos foram obtidos a partir de biomassas que cresceram em produtividade volumétrica satisfatória (Tabela 4.6):  $0,226 \pm 0,005 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (*A. platensis*) e  $0,435 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (bactérias heterotróficas).

Figura 23 – Análise colorimétrica para quantificação de glicerol na cultura de *A. platensis* e bactérias heterotróficas em meio amoniacal contendo Glicerol bruto residual por batelada alimentada



Legenda: Os três tubos em amarelo são os resultados das análises colorimétricas das amostras iniciais dos experimentos em garrafões contendo Glicerol bruto residual. As três últimas são os resultados das amostras ao fim do bioprocessamento, indicando ausência de glicerol no meio.

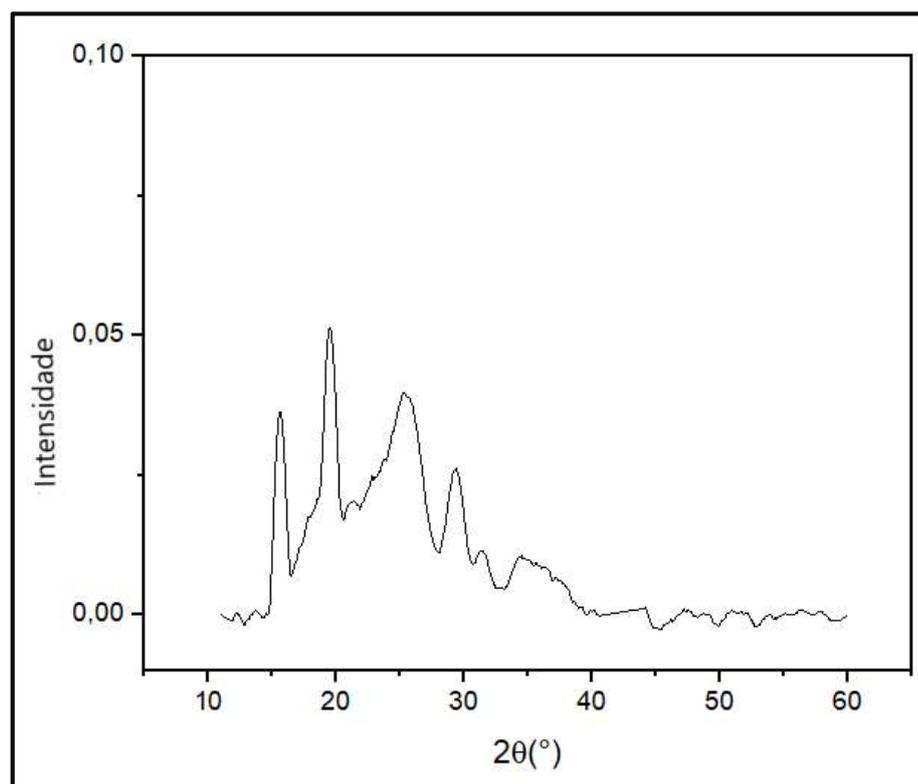
Fonte: O autor, 2022.

Em relação a caracterização dos biopolímeros produzidos durante o bioprocessamento inicialmente foi feita a análise de DRX para avaliar o percentual da estrutura cristalina dos biopolímeros produzidos. Os resultados (Gráfico 19) indicam uma estrutura semicristalina com os seguintes picos em  $2\theta$ :  $15,57^\circ$ ;  $19,5^\circ$ ;  $25,29^\circ$ ;  $29,35^\circ$  e  $31,42^\circ$ . A porcentagem da área total do gráfico em relação à área cristalina indica o grau de cristalinidade na estrutura de 49,6%, 50% aproximadamente.

Costa et al. (2018) mencionam que os biopolímeros com percentual de cristalinidade superior a 50% podem ter uma rigidez que possa interferir em suas aplicações posteriores na produção de plásticos biodegradáveis. O percentual obtido foi similar ao obtido em Costa et al.

(2018) por *A. platensis*, entre 50,15 e 51,65%. Costa et. al. (2018) cita o estudo de Campos et al. (2014), que relatam o percentual entre 52.23 e 66.12% para PHA produzidos pela bactéria heterotrófica *Cupriavidus necator*.

Gráfico 19 – Resultado da análise de DRX do biopolímero extraído e produzido durante o bioprocesso para remoção de nitrogênio amoniacal

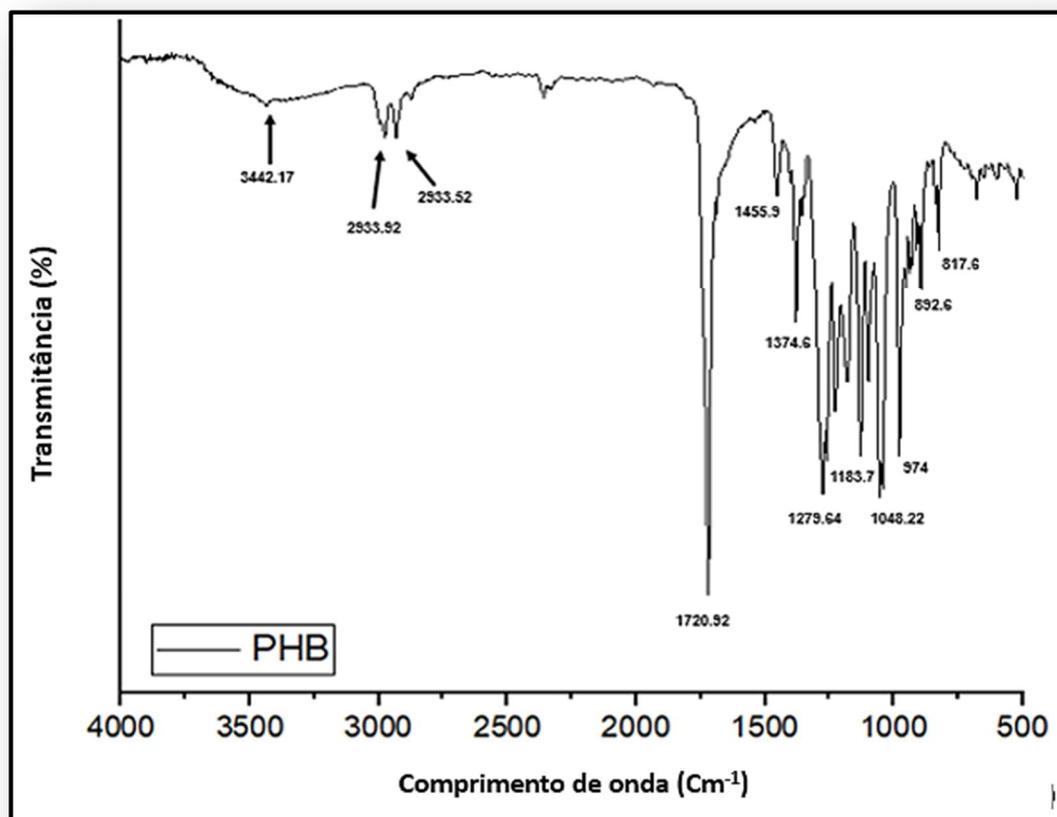


Legenda: A figura ilustra a característica semicristalina do biopolímero produzindo, havendo regiões amorfas e cristalinas, identificadas através dos picos do gráfico.

Fonte: O autor, 2022.

Em seguida, avaliou-se os resultados da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada (FTIR-ATR) dos biopolímeros produzidos durante o bioprocesso. Segundo a análise da Gráfico 20 e da Tabela 4.7, pode-se deduzir que o biopolímero produzido apresentou bandas características e similares às do PHB.

Gráfico 20 – Espectrograma da análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada (FTIR-ATR) dos biopolímeros produzidos durante o bioprocesso



Fonte: O autor, 2022.

O biopolímero apresentou semelhanças às bandas referentes aos grupos funcionais característicos deste polímero (PHB) relatados na literatura, como, por exemplo, a banda relacionada ao alongamento do carbonil (C=O) da ligação éster (1721 cm<sup>-1</sup>) característico dos poliésteres, além de uma serie de bandas apresentadas na faixa compreendida entre 1000 a 1300 cm<sup>-1</sup>, que estão relacionadas as ligações de alongamento da ligação C-O do grupo éster. Os resultados sugerem a classificação química do material produzido neste trabalho ao polihidroxibutirato (PHB). Baseou-se nos seguintes estudos para obtenção das bandas características do PHB: SABARINATHAN et al., 2018; TRAKUNJAE et al., 2021; SARATALE et al., 2021.

Tabela 4.7 – Comparação das bandas resultantes da análise de FTIR do biopolímero produzido no bioprocesso desenvolvido às bandas características do PHB reportadas na literatura.

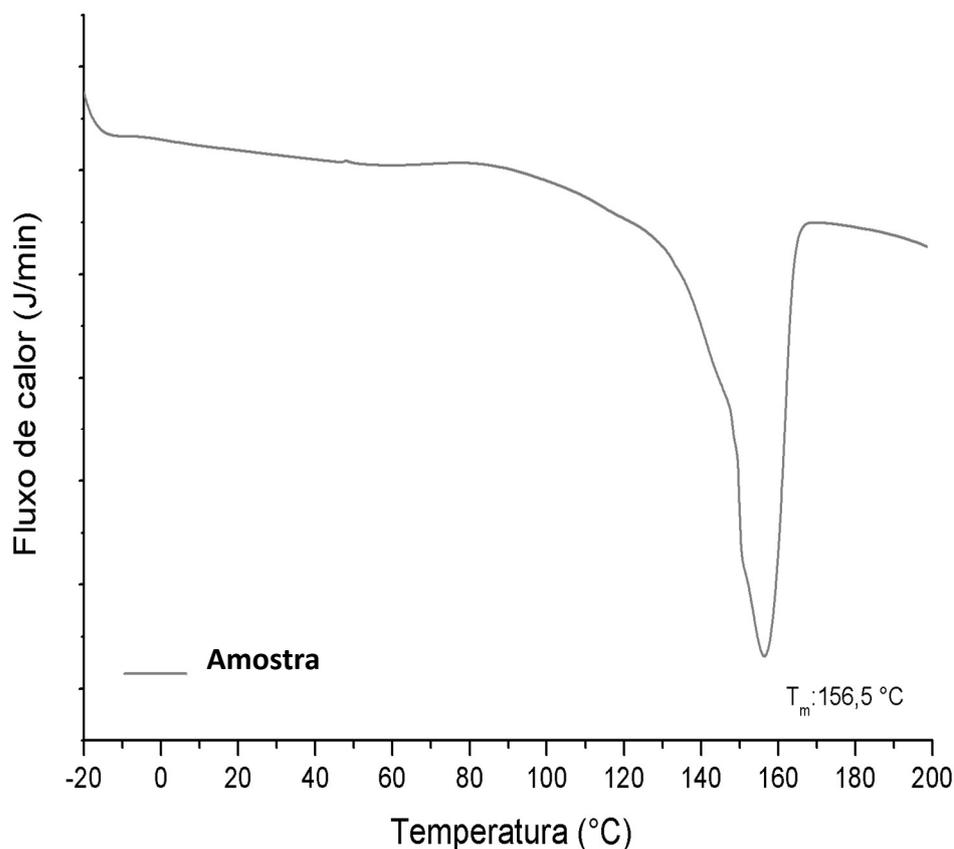
Valores do PHB encontrados na literatura [cm <sup>-1</sup> ]	Valor medido na amostra [cm <sup>-1</sup> ]	Grupamento característico
3443,70	3442,17	OH
2975,70	2976,97	Estiramento simétrico e assimétrico do CH <sub>3</sub>
2933,00	2933,52	Metileno CH <sub>2</sub> com vibração simétrica e assimétrica
1721,00	1720,32	C=O Ester, estiramento
1454,50	1455,90	O – H, estiramento
1379,63	1374,60	
1277,55	1279,64	-CH
1227,61	1231,76	
1183,27	1184,68	C – O
1132,44	1130,41	
1100,89	1096,11	-C-O-C- Estiramento com vibração assimétrica
1055,81	1048,22	
979,81	974,00	

Fonte: O autor, 2022.

As transições térmicas do polímero produzido neste trabalho foram avaliadas usando análise calorimétrica exploratória (DSC) com resultado mostrado na Gráfico 21. Os valores obtidos para a temperatura de fusão ( $T_m$ ) e entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) do biopolímero foram 156,4°C e 93,6 (J/g).

As transições térmicas encontradas por DSC para o biopolímero produzido no presente estudo, corroboraram com as transições características do PHB. A temperatura de fusão dos cristalitos ( $T_m$ ) a 156,5 °C, aproximadamente, concorda com o registrado por Cavalcante e colaboradores (2017), que reportaram a temperatura de fusão para os cristais formados ( $T_m$ ) pelo PHB entre 156 e 170 °C (CAVALCANTE et al., 2017).

Gráfico 21 – Termograma de DSC obtido diante do aquecimento do biopolímero extraído e produzido durante o bioprocesso desenvolvido.

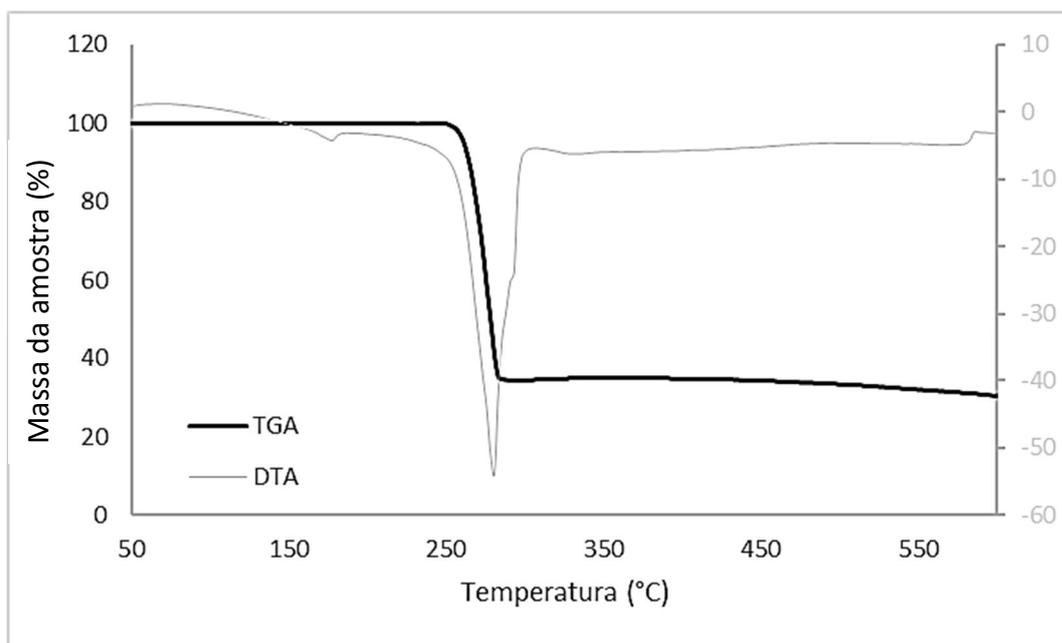


Fonte: O autor, 2022.

A Gráfico 22 ilustra o resultado da análise termogravimétrica. Percebe-se um comportamento padrão de degradação para PHB em uma única etapa sob atmosfera de nitrogênio (240 – 400 °C) (TRAKUNJAE et al., 2021; AGUIAR et al., 2021). A variação de massa apresentou uma rápida queda referente a degradação para uma temperatura inicial de 286 °C até 310 °C.

Por outro lado, no termograma representado no Gráfico 22, é observado que ocorreu uma perda de 74% da massa do biopolímero, aproximadamente. Isso indica que, além do PHB produzido, há 26% de impurezas e ou resíduos no material extraído. Dessa forma, há a necessidade de avaliar outros métodos de extração do PHB ou de incluir uma metodologia de purificação dos PHB produzidos durante o bioprocessos desenvolvido no presente estudo.

Gráfico 22 – Termograma da análise de TGA do biopolímero produzido



Fonte: O autor, 2022.

Segundo Higuchi-takeuchi et al. (2016), a massa molar dos polímeros é uma das propriedades mais importantes dos materiais poliméricos já que pode afetar de forma significativa suas propriedades físicas e mecânicas. PHA que apresentam alta massa molar são desejáveis para suas futuras aplicações práticas, principalmente pelos métodos de extração dos biopolímeros possivelmente resultarem em uma diminuição de sua massa molar. Além disso, PHA com elevada massa molar possuem melhores propriedades mecânicas. A análise de GPC mostrou que o PHB produzido no presente estudo apresenta uma massa molar de  $935 \times 10^3$  g/mol. Considera-se, portanto, segundo Higuchi-takeuchi et al. (2016), que o polímero produzido apresenta uma alta massa molar, sendo atrativo para sua aplicação posterior como precursor da produção de plásticos biodegradáveis.

Na presente fase do estudo, realizado em um maior volume útil em comparação à fase anterior, verificou-se a ausência de nitrato e nitrito no meio após 8 dias de bioprocessamento. Isso sugere a baixa complexidade para remoção do nitrogênio amoniacal por esse bioprocessamento, que pode ser realizado em um único reator. Sabe-se que a ausência da produção de nitrato e nitrito pelas cianobactérias pode ser explicada pelo fato de incorporarem diretamente o nitrogênio amoniacal nos esqueletos carbônicos e, conseqüentemente, na produção de biomassa pela via GS-GOGAT (SALBITANI; CARFAGNA, 2021). Por outro lado, não conhecemos as vias bioquímicas de assimilação do nitrogênio amoniacal das bactérias heterotróficas. Supõe-se que,

mesmo que as bactérias heterotróficas produzam nitrato e nitrito, é possível que tenham sido consumidas por *A. platensis* devido à versatilidade das fontes de nitrogênio que esta espécie é capaz de consumir (RAHIMI; MODIN; MIJAKOVIC, 2020). Isso exemplifica outro aspecto positivo da cultura mista entre bactérias heterotróficas e *A. platensis*.

Em relação à comparação da remoção de nitrogênio amoniacal alcançada pelo bioprocessamento do presente estudo, a remoção de nitrogênio amoniacal total e a eficiência de remoção dessa fonte de nitrogênio foram superiores às alcançadas por diferentes estudos publicados recentemente, que têm como proposta usar microalgas para remover nitrogênio amoniacal de efluentes industriais, exemplificado na Tabela 4.8: Luo et al. (2018); (Álvarez; Otero, 2020); Shen et al. (2020); Sayedin et al. (2020) e Jiang et al. (2021). O bioprocessamento desenvolvido na maioria desses estudos citados foi realizado por batelada simples e com baixa concentração inicial de microalgas (0,14 a 0,15 g.L<sup>-1</sup>), atingindo uma remoção total entre 65,93±0,98 a 210 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal, com eficiência de remoção entre 58,4 e 95,6%.

Chen et al. (2018) e Lee et al. (2021) alcançaram avanços significativos relacionados à biorremediação de nitrogênio amoniacal por microalgas. Chen et al. (2018), ao realizarem o bioprocessamento com *C. sorokiniana* FACHB-275 em modo contínuo, obtiveram uma remoção diária de 18,1±0,6 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal em 45 dias de bioprocessamento, totalizando a remoção de aproximadamente 814,5 mg.L<sup>-1</sup> (consumido ou removido por evaporação). No entanto, uma menor produtividade de biomassa foi alcançada quando comparada à produtividade em biomassa do presente estudo. O produto de interesse industrial analisado foi o conteúdo em proteínas totais da biomassa (45,6±1,7%).

Mais tarde, Lee et al. (2021) ao usar *Coelastrrella* sp. em batelada simples, alcançou a remoção de nitrogênio amoniacal de 950 mg.L<sup>-1</sup> (consumido ou removido por evaporação), com eficiência de remoção de 99% e produtividade volumétrica de biomassa de 0,225 g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> em 4 dias de bioprocessamento. Os autores utilizaram uma alta concentração inicial de microalgas de 7 g.L<sup>-1</sup> como estratégia. Considerando que a biomassa produzida também é uma fonte de bioprodutos a serem comercializados, elevado inóculo desse bioprocessamento (próximo a 7 g.L<sup>-1</sup>) pode aumentar sua complexidade, em comparação com o presente estudo em que se usou, aproximadamente, 1,4 g.L<sup>-1</sup> de inóculo.

Tabela 4.8 - Estudos recentes relacionados à remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes por tratamento biológico com microalgas. \* Dados estimados com base nas informações contidas no artigo. O símbolo (–) expressa a informação não encontrada nos artigos citados.

Micro-organismo	Modo de condução	Tipo de efluente	Fonte orgânica	Inóculo (g.L <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> removido (mg.L <sup>-1</sup> )	EF (%)	Nitrito e ou nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	Ensaio de perda de NH <sub>3</sub> por evaporação ou estimativa de N intracelular	X (g.L <sup>-1</sup> )	Qx (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtos de interesse industrial	Tempo (d)	Referência
<i>Coelastrrella</i> sp.	Batelada simples	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de suínos	Do próprio efluente	7	950	99	–	Não avaliado	7,9	0,225	Conteúdo lipídico (%): 37	4	LEE et al., 2021
<i>Chlorella vulgaris</i> NIES-227	Batelada simples	Efluente sintético	–	0,3	210	58,4	–	Não avaliado	4,55 ±0,04	0,533±0,005	Conteúdo lipídico (%): 25-30*; Carboidratos (%): 30-35*; Proteínas (%): 15-20*	8	JIANG et al., 2021
<i>Arthrospira</i> sp.	Batelada alimentada	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de pescado	Do próprio efluente	–	–	56,5	Ausência de nitrato	Avaliado	5±0,1	–	Proteínas (mg.mL <sup>-1</sup> ): 2,5 ± 0,2; Ficocianina (mg.g <sup>-1</sup> ): 73,7±7,7	24	ÁLVAREZ; OTERO, 2020
<i>Chlorella sorokiniana</i> (UTEX 1230)	Batelada simples	Efluente da digestão anaeróbica de destilaria	Do próprio efluente	Abaixo de 0,5 *	124,9	95,6	Nitrato: 1,73	Avaliado	2,11	–	Proteínas (%): 37,8 ± 3; Amido (%): 17,8 ± 0,8; Conteúdo lipídico (%): 8,9 ± 0,3	18	SAYEDIN et al., 2020

<i>C. sorokiniana</i> FACHB-275	Batelada simples	Efluente sintético	Acetato de sódio e propionato de sódio	–	65,93 ± 0,98	–	–	Avaliado	0,5 ± 0,07	–	Carotenoides totais(mg.g <sup>-1</sup> ): 1,92± 0,04; Polissacarídeos (mg.g <sup>-1</sup> ): 48,43±1,06; Proteínas/polissacarídeos (mg.mg <sup>-1</sup> ): 1,98±0,09	5	SHEN et al., 2020
<i>Desmodesmus</i> sp. CHX1	Batelada simples	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de suínos	Do próprio efluente	0,14	78,47*	70,59±1,56	–	Avaliado	0,84±0,02	0,1	–	7	LUO et al., 2019
<i>C. sorokiniana</i> FACHB-275	Contínuos	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de suínos	Do próprio efluente	0,112	18,1±0,6 (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> ) Total (mg.L <sup>-1</sup> ): 814,5	–	–	Não avaliado	2,188	–	Proteínas totais (%): 45,6±1,7	45	CHEN et al., 2018
Chlorellaceae sp. P5	Batelada simples	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de suínos	Do próprio efluente	–	97,3	100	Nitrato: entre 4 e 6*	Avaliado	–	0,49	Lipídios: 0,13 g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup>	6	CHIANG et al., 2018
Consórcio de microalgas: <i>Chlorella</i> sp. e <i>Scenedesmus</i> sp.	Batelada alimentada	Efluente da digestão anaeróbica da indústria de suínos	Do próprio efluente	–	63,7±1,21 mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> Total (mg.L <sup>-1</sup> ): 2293,2*	–	–	Não avaliado	–	0,0185	–	36*	AYRE; MOHEIMANI; BOROWITZKA, 2017

Fonte: O autor, 2022.

Em relação às estratégias utilizadas para melhorar os métodos biológicos tradicionais e para remover o nitrogênio amoniacal de efluentes, alguns estudos são citados na Tabela 4.9. Os resultados de Arriagada et al. (2017) indicam que a nitrificação parcial simultânea ao processo anammox e à desnitrificação é promissora para a biorremediação de nitrogênio amoniacal de efluentes industriais. Em geral, nos estudos de Arriagada et al. (2017); Connan et al. (2018); Zeng et al. (2018); Pishgar et al. (2019) são removidas concentrações satisfatórias de nitrogênio amoniacal (entre 76 e 359,4 mg.L<sup>-1</sup>) com eficiência de remoção entre 53,3 e 89,85% em ciclos de 4 a 24 horas.

No entanto, além da ausência de produção de compostos de interesse industrial nesses estudos, exceto proteínas para aplicação como biofertilizantes, esses resultados foram alcançados após longos períodos de adaptação do bioprocesso e de crescimento dos micro-organismos (30 a 202 dias). Após a análise dos resultados obtidos do presente estudo, com uma remoção diária de nitrogênio amoniacal, próxima a 100 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>, alcançando 604±2 mg.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal removido, com eficiência de remoção próxima a 100% e após 8 dias, pode-se observar que o bioprocesso desenvolvido é promissor para a biorremediação de nitrogênio amoniacal de efluentes industriais.

Embora, neste estudo, não tenham sido utilizados efluentes reais, o principal fator que diferenciaria o desempenho de *A. platensis* nas duas diferentes condições seria o impacto da cor do efluente na fotossíntese (AL-JABRI et al., 2021). Tal impacto seria atenuado uma vez que a presença de glicerol bruto residual estimula o metabolismo mixotrófico e a independência do aparelho fotossintetizante (LI et al., 2019c). Além disso, o desenvolvimento de bioprocessos com meios definidos são essenciais para a obtenção de concentrações ótimas de nutrientes para suplementação de efluentes a fim de se garantir uma boa eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal pelos micro-organismos (ZHAI et al., 2017).

Ao analisar os produtos de interesse industrial produzidos neste bioprocesso, focou-se nos biopolímeros biodegradáveis (polihidroxialcanoatos), pois sua produção é induzida na presença de uma fonte de carbono orgânico (PHALANISONG; PLANGKLANG; REUNGSANG, 2021). Notou-se que houve maior produção de biopolímeros nos experimentos em frascos agitados em relação à produção em garrafões deste presente estudo. Tendo em vista o crescimento abundante de bactérias heterotróficas quando aumentou-se a escala, o bioprocesso foi encerrado previamente porque pensou-se que os biopolímeros estavam sendo produzidos principalmente por *A. platensis*.

Tabela 4.9 - Diferentes estudos com estratégias recentes para melhorar a remoção de nitrogênio amoniacal por processos de nitrificação, desnitrificação e Anammox. \* Dados estimados com base nas informações contidas no artigo. O símbolo (–) expressa a informação não encontrada nos artigos citados

Processo	Micro-organismo	Condução	Tipo de efluente	Fonte orgânica	Inóculo (g.L <sup>-1</sup> )	NH <sub>3</sub> Removido (mg.L <sup>-1</sup> )	EF (%)	Nitrito e ou nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	Ensaio de perda de NH <sub>3</sub> por evaporação ou estimativa de N intracelular	Tempo de operação de 1 ciclo (h)	Tempo para adaptação do bioprocessos (d)	Referência
Nitrificação heterotrófica simultânea a desnitrificação aeróbica	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	Batelada simples	Efluente doméstico	Do próprio efluente	–	–	27,9	Nitrato e nitrito abaixo de 5	Analisado	96	–	CUI; CUI; HUANG, 2021
Nitrificação	Lodo ativado	Batelada simples com reciclagem de células	Águas residuais de curtume	Do próprio efluente	3	127,31	80,26	–	Não analisado	3	–	LI et al., 2019a
Desnitrificação utilizando biomassa granular	Lodo ativado	Reator em batelada sequencial (SBR)	Efluente sintético	Acetato de sódio e propionato de sódio	2,8	76	76	Consumo total	Não analisado	4	31	PISHGAR et al., 2019
Nitrificação parcial integrada à desnitrificação	Lodo	Reator em batelada sequencial (SBR)	Efluente sintético	Amido e peptona	–	319,8	53,3	Consumo total	Não analisado	8	30	ZENG et al., 2018b

Nitrificação por filme suspenso de lodo ativado	Lodo ativado	Reator em batelada sequencial (SBR)	Efluente sintético	Acetato de sódio	–	400	97	Acúmulo de nitrito entre 700 e 800	Não analisado	12	350	SHAO et al., 2018
Nitrificação parcial integrada ao processo Anammox	Lodo ativado e lodo do processo Anammox	Reator em batelada sequencial (SBR)	Efluente de digestão anaeróbica	Do próprio efluente	1,8 lodo ativado e 1,05 de lodo do processo Anammox	–	72-81	Nitrito: 26 Nitrito: 21	Analisado	8	42	CONNAN et al., 2018
Nitrificação parcial simultânea ao processo Anammox e à desnitrificação	Lodo ativado	Reator em batelada sequencial (SBR)	Lixiviado de aterro sanitário	Do próprio efluente	6,5± 0,3	200	99	Nitrito e Nitrito abaixo de 10	Não analisado	30	60-130	ZHANG et al., 2017
Nitrificação parcial simultânea ao processo Anammox e à desnitrificação	Consórcio entre diferentes espécies de bactérias	Processo contínuo	Efluente da digestão anaeróbica da produção de bovinos	Do próprio efluente	0,55	359,4	89,8	–	Analisado	24*	202	ARRIAGADA et al., 2017
Nitrificação heterotrófica simultânea à desnitrificação aeróbica	<i>Bacillus cereus</i> GS-5	Batelada simples	Efluente doméstico	Do próprio efluente	–	96	96	Nitrito e nitrito abaixo de 5	Analisado	36*	–	ROUT; BHUNIA; DASH, 2017

. Fonte: O autor, 2022.

Havia o receio de que bactérias heterotróficas pudessem comprometer o fluxo de glicerol para as cianobactérias e que estender sua fase estacionária pudesse levar à degradação de biopolímeros produzidos. No entanto, surpreendentemente, observou-se a produção majoritária dos biopolímeros pelas bactérias heterotróficas, já que houve um aumento significativo dos PHA na biomassa recuperada por centrifugação. Os polihidroxialcanoatos tendem a ser produzidos, principalmente, na fase estacionária do crescimento celular (SINGH SAHARAN; GREWAL; KUMAR, 2014). Pode-se observar, no gráfico 16, que o bioprocessamento foi encerrado antes que a fase estacionária fosse mantida pelas bactérias heterotróficas, onde o consumo de glicerol seria utilizado para a síntese dos biopolímeros. Atribuímos isso à menor produção de polihidroxialcanoatos na nesta fase do estudo em comparação aos experimentos em frascos agitados da fase anterior.

Além disso, é importante ressaltar que se a biomassa liofilizada utilizada na extração dos biopolímeros contivesse apenas as bactérias heterotróficas, o resultado seria maior. No experimento anterior, realizado em frascos agitados e que gerou o maior rendimento de polihidroxialcanoatos, a biomassa total produzida correspondeu a 26,7% de bactérias heterotróficas e 73,29% de *A. platensis*. Considerando que os biopolímeros são produzidos principalmente pelas bactérias heterotróficas, em 1 g de biomassa liofilizada composta por bactérias e *A. platensis*, 26,7% desse valor foi efetivo na extração (0,27g). Calculando o rendimento do PHA obtido em relação à massa efetiva na extração (0,27 g) é possível obter um rendimento teórico de  $49 \pm 7\%$  em polihidroxialcanoatos na biomassa ( $490 \text{ mg.g}^{-1}$ ).

Existem alguns estudos que avaliam a produção de biopolímeros por micro-organismos cultivados em efluentes industriais, como Passanha et al. (2013), Conca et al. (2020), Heepkael e Suwannasilp. (2020), Mulders et al. (2020) e Almeida et al. (2021) com rendimentos em polihidroxialcanoatos na biomassa (%) respectivamente: 90; 46,8; 21,8; 61; 30,8. No entanto, os bioprocessos mencionados nesses estudos não sincronizam a produção desses biopolímeros a uma elevada eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, além de elevadas concentrações de nitrogênio amoniacal consumido e ausência da produção de nitrito e nitrato como intermediários.

Além disso, pigmentos de elevado valor agregado foram produzidos por *A. platensis* neste estudo como a ficocianina ( $84,2 \pm 2,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ). O acúmulo em ficocianina por *A. platensis*, juntamente ao seu percentual em proteínas totais, é atrativo quando comparado a estudos de produção de tais compostos por microalgas em mixotrofia: Li et al. (2018); Manirafasha et al. (2018); e Álvarez e Otero (2020). Foi relatado, previamente, que a presença de fontes orgânicas de carbono tende a diminuir o acúmulo de pigmentos pelas cianobactérias. Provavelmente, o

fato das bactérias heterotróficas também consumirem o glicerol tenha diminuído o fluxo de glicerol para as cianobactérias, fazendo com que sua produção de pigmentos tenha sido favorável mesmo em presença da fonte orgânica de carbono. Isso exemplifica outro aspecto benéfico do consórcio entre *A. platensis* e bactérias heterotróficas.

Por fim, avaliamos uma proposta inovadora da inserção de glicerol bruto residual de biodiesel para biorremediação de nitrogênio amoniacal, presente em altas concentrações em efluentes industriais, avaliando também o desempenho de uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas. Estudos recentes têm demonstrado o uso de ferramentas moleculares avançadas para identificação da comunidade de bactérias envolvidas nos processos tradicionais de remoção de nitrogênio amoniacal de efluentes, que podem ser utilizadas para identificar as bactérias heterotróficas do presente estudo (ZENG et al., 2018b; LI et al., 2019a; PISHGAR et al., 2019).

A utilização do glicerol bruto juntamente com as características deste bioprocesso é promissora para ser avaliada em bioprocessos com outras espécies de microalgas e cianobactérias avaliando, também, a produção de outros compostos de interesse industrial. A produção de lipídios para produção de biodiesel por microalgas é promissora, pois os biopolímeros assim como os lipídios possuem condições semelhantes que potencializam sua produção, pois ambos são utilizados pelas microalgas e cianobactérias como compostos de reserva energética (ALISHAH ARATBONI et al., 2019). Além disso, a produção de biodiesel poderia gerar mais glicerol bruto residual para essa cadeia produtiva em um conceito de biorrefinaria (RAZA; INAYAT; ABU-JDAYIL, 2021).

Vivenciamos, atualmente, sérias crises políticas que afetaram diretamente o preço dos derivados de petróleo (FOUAD, 2022). Essa situação levará a sociedade a buscar, cada vez mais, por possíveis candidatos à substituição desses compostos, potencializando a demanda pela produção de biodiesel e por bioplásticos biodegradáveis (PAVLIUKH et al., 2020; CNS, 2022). Assim, as características do bioprocesso desenvolvido neste presente estudo (a concentração inicial de biomassa utilizada, as características da condução por batelada alimentada, a concentração de nutrientes no meio de produção, a concentração de glicerol bruto residual alimentada no sistema, o controle de pH através do cultivo misto e a concentração diária de nitrogênio amoniacal alimentada) podem viabilizar sob os aspectos tecnológicos e econômicos o tratamento de efluentes com fontes amoniacais indústrias além de transformar a problemática ambiental da presença de nitrogênio amoniacal nos efluentes industriais em produtos substituintes dos derivados de petróleo.

## CONCLUSÃO

- A cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* foi selecionada para o presente estudo, dentre as demais espécies avaliadas, pela eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal, produtividade em biomassa, facilidade dos métodos analíticos e produção de compostos de interesse industrial;
- A sinergia entre a estratégia de aumentar a concentração inicial de biomassa de *A. platensis* e conduzir o bioprocesso por batelada alimentada em autotrofia proporcionou a remoção de nitrogênio amoniacal próxima a 200 mg.L<sup>-1</sup> em eficiência de remoção em torno de 90%. A biomassa produzida nesse bioprocesso teve um elevado acúmulo em ficocianina na biomassa próximo a 190 mg.g<sup>-1</sup>.
- A inserção inovadora do glicerol bruto residual da produção de biodiesel para biorremediação do nitrogênio amoniacal em meios amoniacais por cianobactérias estimulou a mixotrofia em *A. platensis* e o estabelecimento de uma cultura mista com bactérias heterotróficas, que aumentaram a assimilação do nitrogênio amoniacal, a eficiência de remoção e a produção de biopolímeros com satisfatória produtividade em biomassa;
- O cultivo misto entre *A. platensis* e bactérias heterotróficas manteve o pH do sistema próximo ao pH inicial do cultivo, sendo uma estratégia de baixo custo para controlar o pH do sistema e diminuir a toxicidade do nitrogênio amoniacal.
- O bioprocesso desenvolvido removeu aproximadamente 600 mg.L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub>, em eficiência de 100%, em 8 dias de bioprocesso, com o sistema ainda estável e em um consumo diário de NH<sub>3</sub> próximo a 100 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> no oitavo dia. As concentrações finais na cultura de NH<sub>3</sub>, nitrito e nitrato foram nulas;
- Observou-se o potencial biotecnológico para toda biomassa produzida no bioprocesso. As bactérias heterotróficas apresentaram o potencial como produtoras de biopolímeros enquanto a cianobactéria estudada (*A. platensis*) acumulou 80 mg.g<sup>-1</sup> de ficocianina na biomassa. Ambas as biomassas foram facilmente separadas por filtração o que facilitou a recuperação e separação dos diferentes bioprodutos produzidos;
- Houve o acúmulo teórico de biopolímero na biomassa próximo a 40% e os resultados da caracterização do biopolímero produzido no bioprocesso foram compatíveis às características do polihidroxibutirato (PHB).

## REFERÊNCIAS

- ABINANDAN, S.; SHANTHAKUMAR, S. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 52, p. 123–132, 1 dez. 2015.
- ABOMOHRRA, A. et al. Effect of lipid-free microalgal biomass and waste glycerol on growth and lipid production of *Scenedesmus Obliquus*: Innovative waste recycling for extraordinary lipid production. *Bioresource Technology*, v. 249, p. 992–999, 1 fev. 2018.
- ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GÓMEZ-SERRANO, C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M. Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 2, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2018.00059>>. Acesso em: 29 abr. 2022.
- AGUIAR, L. O. et al. Evaluation of the properties of the polymer Polyhydroxybutyrate (PHB) extracted from *Zophobas Morio Fabricius* Worms. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 26, n. 1, 2021. Disponível em: <[http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1517-70762021000100325&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1517-70762021000100325&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 7 maio. 2022.
- AKIZUKI, S. et al. Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and Partial Nitrifying Granules. *Water Research*, v. 171, p. 115445, 15 mar. 2020.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; MALAFAIA, C. B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from Polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 615–625, 1 fev. 2018.
- ALI, M.; OKABE, S. Anammox-Based technologies for nitrogen removal: advances in Process Start-up and remaining issues. *Chemosphere*, v. 141, p. 144–153, dez. 2015.
- ALISHAH ARATBONI, H. et al. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, v. 18, n. 1, p. 178, 21 out. 2019.
- AL-JABRI, H. et al. Treatment of wastewaters by microalgae and the potential applications of the produced biomass—A Review. *Water*, v. 13, n. 1, p. 27, jan. 2021.
- ALMEIDA, J. R. et al. Polyhydroxyalkanoates production from fermented domestic wastewater using phototrophic mixed cultures. *Water Research*, v. 197, p. 117101, 1 jun. 2021.
- ÁLVAREZ, X.; OTERO, A. Nutrient removal from the centrate of anaerobic digestion of high ammonium industrial wastewater by a semi-continuous culture of *Arthrospira* sp. and *Nostoc* sp. PCC 7413. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, n. 5, p. 2785–2794, 1 out. 2020.
- ANJUM, A. et al. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAS) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 89, p. 161–174, 1 ago. 2016.
- ANSARI, S.; FATMA, T. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. e0158168, 30 jun. 2016.

ARORA, K. et al. Valorization of wastewater resources into biofuel and value-added products using microalgal system. *Frontiers in Energy Research*, v. 9, p. 1-25, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenrg.2021.646571>>. Acesso em: 2 maio. 2022.

ARRIAGADA, C. et al. NOB suppression and adaptation strategies in the partial nitrification–anammox process for a poultry manure anaerobic digester. *Process Biochemistry*, v. 58, p. 258–265, 1 jul. 2017.

ARUMUGAM, A. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*. Oxford: Elsevier, 2020. p. 236–252.

AYRE, J.; MOHEIMANI, N.; BOROWITZKA, M. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Research*, v. 24, p. 218–226, 1 jun. 2017.

BANO, K. et al. Microbial enzymatic degradation of biodegradable plastics. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 18, n. 5, p. 429–440, 2017.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1973.

BHATI, R.; MALLICK, N. Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum agardh*: process optimization and polymer characterization. *Algal Research*, v. 7, p. 78–85, 1 jan. 2015.

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *European journal of lipid science and technology*, v. 107, n. 3, p. 153–157, 2005.

CAMPOS, M. I. et al. The influence of crude glycerin and nitrogen concentrations on the production of pha by *Cupriavidus necator* using a response surface methodology and its characterizations. *Industrial Crops and Products*, v. 52, p. 338–346, 1 jan. 2014.

CAMPOS, M. I. *Polihidroxicanoatos (PHAs) obtidos a partir da glicerina bruta residual do biodiesel (GBRB): produção, otimização, cinética e propriedade*. 2016. 148 f. Universidade Federal da Bahia, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/handle/ri/19126>>. Acesso em: 2 maio. 2022.

CAROLINE BAETTKER, E. et al. Applicability of conventional and non-conventional parameters for municipal landfill leachate characterization. *Chemosphere*, v. 251, p. 126414, 1 jul. 2020.

CARPINE, R. et al. The cyanobacterial route to produce Poly-β-hydroxybutyrate. *Chemical Engineering Transactions*, v. 43, p. 289–294, 1 jan. 2015.

CARPINE, R. et al. Photoautotrophic production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria: nitrate effects and screening of strains. *Environ Eng Manag J*, v. 18, n. 6, p. 1337–1346, 2019.

CAVALCANTE, M. P. et al. Correlation between traditional techniques and TD-NMR to determine the morphology of PHB/PCL blends. *Polymer Testing*, v. 58, p. 159–165, 1 abr. 2017.

CHAKRAVARTY, P.; MHAISALKAR, V.; CHAKRABARTI, T. Study on Poly-Hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 8, p. 2896–2899, abr. 2010.

CHEN, X. et al. Nitrogen and phosphorus removal from anaerobically digested wastewater by microalgae cultured in a novel membrane photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, v. 11, 9 jul. 2018.

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

CHIANG, Y. L. et al. Biomass and lipid production of a novel microalga, *Chlorellaceae* sp. P5, through heterotrophic and swine wastewater cultivation. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, v. 10, p. 033102, 1 maio 2018.

CHILAKAMARRY, C. R. et al. Technological perspectives for utilisation of waste glycerol for the production of biofuels: A Review. *Environmental Technology & Innovation*, v. 24, p. 101902, 1 nov. 2021.

CHOZHAVENDHAN, S. et al. Assessment of crude glycerol utilization for sustainable development of biorefineries. *Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts*. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 195–212.

CNS. *Could war in Europe boost the bioplastics industry? Tipa calls for fossil fuel disconnect*. Disponível em: <<https://pi.cnsmedia.com/a/xjs578iBLT4=>>>. Acesso em: 2 maio de 2022.

CONAMA. Resolução N° 430 de 13 de maio de 2011. Disponível em: <[http://conama.mma.gov.br/?option=com\\_sisconama&task=arquivo.download&id=627](http://conama.mma.gov.br/?option=com_sisconama&task=arquivo.download&id=627)>. Acesso em: 29 abr. 2022.

CONCA, V. et al. Long-term validation of polyhydroxyalkanoates production potential from the sidestream of municipal wastewater treatment plant at pilot scale. *Chemical Engineering Journal*, v. 390, p. 124627, 2020.

CONNAN, R. et al. Coupling of partial nitritation and anammox in two- and one-stage systems: process operation, N<sub>2</sub>O emission and microbial community. *Journal of Cleaner Production*, v. 203, p. 559–573, 1 dez. 2018.

CONVERTI, A. et al. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 8–16, 2006.

CORDIER, M.; UEHARA, T. How much innovation is needed to protect the ocean from plastic contamination? *Science of the total environment*, v. 670, p. 789–799, 2019.

CORRÊA, P. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Polyhydroxyalkanoates and pigments coproduction by *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in crude glycerol. *Journal of Applied Phycology*, v. 33, n. 3, p. 1487–1500, 1 jun. 2021.

COSTA, J. A. V. et al. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 439–442, 2001.

- COSTA, J. A. V. et al. Recent advances and future perspectives of PHB production by cyanobacteria. *Industrial Biotechnology*, v. 14, n. 5, p. 249–256, 2018a.
- COSTA, S. S. et al. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *International journal of biological macromolecules*, v. 116, p. 552–562, 2018b.
- COSTA, S. S. et al. Efficacy of *Spirulina* sp. Polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. *Algal Research*, v. 33, p. 231–238, 1 jul. 2018c.
- COSTA, S. S. et al. Microalgae as source of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) - A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 131, p. 536–547, 15 jun. 2019.
- CRUZ-MARTÍNEZ, C. et al. Growth and composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in a tubular photobioreactor using ammonium nitrate as the nitrogen source in a fed-batch process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 32, p. 347–356, 1 jun. 2015.
- CUI, Y.; CUI, Y.-W.; HUANG, J.-L. A novel halophilic *Exiguobacterium mexicanum* strain removes nitrogen from saline wastewater via heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Bioresource Technology*, v. 333, p. 125189, 1 ago. 2021.
- DE CARVALHO, J. C. et al. Culture media for mass production of microalgae. Em: *Biofuels from algae*. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 33–50.
- DE GODOI, L. A. G. et al. Seasonal variation of the organic and inorganic composition of sugarcane vinasse: main implications for its environmental uses. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 28, p. 29267–29282, out. 2019.
- DOS SANTOS, R. R. et al. Evaluation of the co-production of total carotenoids, C-phycocyanin and polyhydroxyalkanoates by *Arthrospira platensis*. *Bioresource Technology Reports*, v. 7, p. 100226, 2019.
- DRATH, M. et al. Ammonia triggers photodamage of Photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiology*, v. 147, n. 1, p. 206–215, maio 2008.
- EPE; MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. *Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis – Ano 2020*, 2021. Disponível em: <[https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-615/NT-EPE-DPG-SDB-2021-03\\_Analise\\_de\\_Conjuntura\\_dos\\_Biocombustiveis\\_ano\\_2020.pdf](https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-615/NT-EPE-DPG-SDB-2021-03_Analise_de_Conjuntura_dos_Biocombustiveis_ano_2020.pdf)>. Acesso em: 29 abr. 2022.
- FOUAD, K. Borders and Pipelines. *Nature Energy*, v. 7, n. 3, p. 213–213, mar. 2022.
- FRANCHINO, M. et al. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, v. 92, n. 6, p. 738–744, 2013.
- FREY, J. Testing for equivalence of variances using Hartley's ratio. *Canadian Journal of Statistics*, v. 38, p. 647–664, 1 dez. 2010.
- FUCHS, W. et al. Tackling ammonia inhibition for efficient biogas production from chicken manure: status and technical trends in Europe and China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 97, p. 186–199, 1 dez. 2018.

GARCÍA, I. L. et al. Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 16–22, 1 fev. 2013.

GARCÍA, M. B. *Producción de polihidroxicanoatos a partir de agua residual de la industria de la cerveza*. 2016. Universidade da Coruña, 2016. 228 f. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=49117>>. Acesso em: 2 maio. 2022.

GEORGE, E. A. *Culture centre of algae and protozoa: list of strains 1976*. 3. ed. [s.l.] Institute of Terrestrial Ecology, 1976.

GUAN, J. et al. Biomass and terpenoids produced by mutant strains of *Arthrospira* under low temperature and light conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 33, fev. 2017.

GUO, B. et al. Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer. *Marine Drugs*, v. 14, n. 7, p. 125, 8 jul. 2016.

GUO, Y. et al. Towards more efficient nitrogen removal and phosphorus recovery from digestion effluent: latest developments in the Anammox-Based Process from the application perspective. *Bioresource Technology*, v. 299, p. 122560, 1 mar. 2020.

HEEPKAEW, P.; SUWANNASILP, B. B. Polyhydroxyalkanoate production using two-stage continuous stirred tank activated sludge systems with glycerol as a carbon source. *Journal of chemical technology and biotechnology*, v. 95, n. 4, p. 1180–1190, 2020.

HIGUCHI-TAKEUCHI, M. et al. Synthesis of high-molecular-weight Polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *PLoS One*, v. 11, n. 8, p. e0160981, 2016.

HO, S. H. et al. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 669–675, 1 jan. 2018.

IBRAHIM, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-Hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, p. 6222–31, 1 set. 2009.

ISMAIEL, M. M. S.; EL-AYOUTY, Y. M.; PIERCEY-NORMORE, M. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 2, p. 298–304, jun. 2016.

JIANG, G. et al. Biomass extraction using non-chlorinated solvents for biocompatibility improvement of Polyhydroxyalkanoates. *Polymers*, v. 10, n. 7, p. 731, jul. 2018.

JIANG, R. et al. The joint effect of ammonium and pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and ammonium removal in artificial liquid digestate. *Bioresource Technology*, v. 325, p. 124690, 11 jan. 2021.

KAUSDAM, S. et al. Kinetic models for phycocyanin production by fed-batch cultivation of the *Spirulina platensis*. *International Journal of Geomatics*, v. 17, p. 187–194, 8 jul. 2019.

KAMRAVAMANESH, D.; LACKNER, M.; HERWIG, C. Bioprocess engineering aspects of sustainable Polyhydroxyalkanoate production in cyanobacteria. *Bioengineering*, v. 5, n. 4, p. 111, 18 dez. 2018.

KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. *Journal of Applied Phycology*, v. 30, p. 1513–1523, 2018.

KIM, B. S. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 10, p. 774–777, 1 dez. 2000.

KOURMENTZA, C. et al. Recent advances and challenges towards sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, v. 4, n. 2, p. E55, 11 jun. 2017.

KOUTRA, E.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; KORNAROS, M. Microalgal post-treatment of anaerobically digested agro-industrial wastes for nutrient removal and lipids production. *Bioresource Technology*, v. 224, p. 473–480, 2017.

KOVALCIK, A. et al. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International journal of biological macromolecules*, v. 102, p. 497–504, 2017.

KUMAR, L. R. et al. A Review on variation in crude glycerol composition, Bio-Valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology*, v. 293, p. 122155, 1 dez. 2019.

KUSHWAH, B. S.; KUSHWAH, A. V. S.; SINGH, V. RETRACTED ARTICLE: Towards understanding Polyhydroxyalkanoates and their use. *Journal of Polymer Research*, v. 23, n. 8, p. 153, 19 jul. 2016.

LAM, W. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *Environmental Technology*, v. 38, n. 13–14, p. 1779–1791, jul. 2017.

LASKAR, N.; KUMAR, U. Plastics and Microplastics: A threat to environment. *Environmental Technology & Innovation*, v. 14, p. 100352, 1 maio 2019.

LEE, S. A. et al. Two-step microalgal (*Coelastrella* sp.) treatment of raw piggery wastewater resulting in higher lipid and triacylglycerol levels for possible production of higher-quality biodiesel. *Bioresource Technology*, v. 332, p. 125081, 1 mar. 2021.

LEHMUSKERO, A.; CHAUTON, M.; BOSTRÖM, T. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, v. 168, p. 43–53, 1 set. 2018.

LI, D. et al. Effect of COD loading on nitrification ability and microbial communities of activated sludge from aerobic nitrifying reactor. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 66, p. 59–70, out. 2019a.

LI, X. et al. Effect of ammonium nitrogen on microalgal growth, biochemical composition and photosynthetic performance in mixotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, v. 273, p. 368–376, 2019b.

LIGHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, v. 148, p. 350–382, 1987.

LIMA, G. et al. Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, v. 31, p. 157–166, abr. 2018.

LIU, R. et al. Cultivation of an *Arthrospira platensis* with digested piggery wastewater. *Water Science and Technology*, v. 72, n. 10, p. 1774–1779, 2015.

LIU, Y. et al. Treatment of real aquaculture wastewater from a fishery utilizing phytoremediation with microalgae. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 94, n. 3, p. 900–910, 1 nov. 2018.

LOCOLI, G. A. et al. Use of biogas digestate obtained by anaerobic digestion and co-digestion as fertilizers: Characterization, soil biological activity and growth dynamic of *Lactuca sativa* L. *Sci. Total Environ*, v. 647, p. 11–19, 2019.

LUO, L. Z. et al. Nutrient removal from piggery wastewater by *Desmodesmus* sp. chx1 and its cultivation conditions optimization. *Environmental Technology*, v. 40, n. 21, p. 2739–2746, set. 2019.

MANIRAFASHA, E. et al. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, v. 255, p. 293–301, may. 2018.

MANNINA, G. et al. Recovery of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Wastewater: A Review. *Bioresource Technology*, v. 297, p. 122478, 1 fev. 2020.

MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. *Bioresource Technology*, v. 193, p. 35–91, 2015.

MARKOU, G.; MUYLAERT, K. Effect of light intensity on the degree of ammonia toxicity on PSII activity of *Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, v. 216, p. 453–461, 1 set. 2016.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Ammonia inhibition on *Arthrospira platensis* in relation to the initial biomass density and pH. *Bioresource Technology*, v. 166, p. 259–265, 2014.

MARTINS, R. et al. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the Cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. *International Journal of Polymer Science*, v. 2014, p. 1–6, 11 dez. 2014.

MARZORATI, S. et al. Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*. Supercritical CO<sub>2</sub> and water extraction methods for added value products cascade. *Green Chemistry*, v. 22, n. 1, p. 187–196, 21 nov. 2019.

MASSA, M. et al. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetradismus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Arthrospira maxima*. *New Biotechnology*, v. 36, p. 8–16, 25 maio 2017.

MEEGODA, J. N. et al. A review of the processes, parameters, and optimization of anaerobic digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 10, p. 2224, out. 2018.

MEIXNER, K. et al. Cyanobacteria biorefinery - production of Poly(3-Hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. *Journal of Biotechnology*, v. 265, p. 46–53, 10 jan. 2018.

MOHD UDAIYAPPAN, A. F. et al. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, v. 20, p. 8–21, 1 dez. 2017.

MORETTI, S. M. L.; BERTONCINI, E. I.; ABREU-JUNIOR, C. H. Characterization of raw swine waste and effluents treated anaerobically: parameters for brazilian environmental regulation construction aiming agricultural use. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, v. 23, n. 1, p. 165–176, jan. 2021.

MORGAN-SAGASTUME, F. et al. Techno-environmental assessment of integrating Polyhydroxyalkanoate (PHA) production with services of municipal wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, v. 137, p. 1368–1381, 20 nov. 2016.

MOURA, Y. A. S. et al. Pigments production, growth kinetics, and bioenergetic patterns in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) in response to different culture media. *Energies*, v. 13, n. 20, p. 5347, jan. 2020.

MULDERS, M. et al. Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate production from organic waste: process characteristics at high pH and high ammonium concentration. *Journal of Environmental Engineering*, v. 146, n. 7, p. 040200492, dec. 2020. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?scp=85084280599&partnerID=8YFLogxK>>. Acesso em: 2 maio. 2022.

MURO-PASTOR, M. I.; FLORENCIO, F. J. Regulation of ammonium assimilation in Cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, n. 6, p. 595–603, 1 jun. 2003.

NAN, L. et al. Study on the removal of high contents of ammonium from piggery wastewater by Clinoptilolite and the corresponding mechanisms. *Open Chemistry*, v. 17, n. 1, p. 1393–1402, 1 jan. 2019.

NEILSON, A. H.; LARSSON, T. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiologia plantarum*, v. 48, n. 4, p. 542–553, 1980.

NIAOUNAKIS, M. *Biopolymers: processing and products*. Ed. Elsevier Science, 546 p. 2014.

NISHIOKA, M. et al. Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* Sp. MA19, under phosphate-limited conditions. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 14, p. 1095–1099, 1 jul. 2001.

OTTONI, B. L. *A relação da comunicação e as embalagens biodegradáveis: um paradigma para a destinação final*. 2016. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção). UNESP, São Paulo, 2016.

- PANDA, B. et al. Optimization of cultural and nutritional conditions for accumulation of Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Synechocystis* Sp. PCC 6803. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 11, p. 1296–1301, jul. 2006.
- PASSANHA, P. et al. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource technology*, v. 147, p. 345–352, 2013.
- PATEL, B. H. Natural dyes. Em: *Handbook of textile and industrial dyeing*. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 395–424.
- PATIAS, L. D. et al. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. *Food research international*, v. 100, p. 260–266, oct. 2017.
- PAVLIUKH, L. et al. Evaluation of the potential of commercial use of microalgae in the world and in Ukraine. *Aircraft Engineering and Aerospace Technology*, v. 93, n. 3, p. 429–436, 1 jan. 2020.
- PEREIRA, S.; OTERO, A. Effect of light quality on carotenogenic and non-carotenogenic species of the genus *Dunaliella* under nitrogen deficiency. *Algal Research*, v. 44, p. 101725, 1 dez. 2019.
- PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y. *Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: from metabolic routes to techno-economics*. Ed. Algal Biorefineries, v. 2, p. 61–131, 2015.
- PHALANISONG, P.; PLANGKLANG, P.; REUNGSANG, A. Photoautotrophic and mixotrophic cultivation of Polyhydroxyalkanoate-accumulating microalgae consortia selected under nitrogen and phosphate limitation. *Molecules*, v. 26, n. 24, p. 7613, 15 dez. 2021.
- PISHGAR, R. et al. Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures. *Bioresource Technology*, v. 281, p. 72–83, 1 jun. 2019.
- POURJAMSHIDIAN, R. et al. Carbon dioxide biofixation by *Chlorella* sp. in a bubble column reactor at different flow rates and CO<sub>2</sub> concentrations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 2, p. 639–645, jun. 2019.
- RAHIMI, S.; MODIN, O.; MIJAKOVIC, I. Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnology Advances*, v. 43, p. 107570, 1 nov. 2020.
- RATNAPURAM, H. P.; VUTUKURU, S. S.; YADAVALLI, R. Mixotrophic transition induced lipid productivity in *Chlorella pyrenoidosa* under stress conditions for biodiesel production. *Heliyon*, v. 4, n. 1, p. e00496, 1 jan. 2018.
- RAYMOND, J. A.; MORGAN-KISS, R.; STAHL-ROMMEL, S. Glycerol is an osmoprotectant in two antarctic chlamydomonas species from an ice-covered saline lake and is synthesized by an unusual bidomain enzyme. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 1259, aug. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.01259>>. Acesso em: 2 maio. 2022.
- RAZA, M.; INAYAT, A.; ABU-JDAYIL, B. Crude glycerol as a potential feedstock for future energy via thermochemical conversion processes: A Review. *Sustainability*, v. 13, n. 22, p. 12813, jan. 2021.

RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 126, p. 45–56, 1 jan. 2018.

RAZZAK, S. A. et al. Biological CO<sub>2</sub> fixation with production of microalgae in wastewater – A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 76, p. 379–390, 1 set. 2017.

RODRIGUES, D. B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, v. 65, p. 144–148, 1 nov. 2014.

RODRIGUES, D. B. et al. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. *Food Research International*. v. 77, p. 273–279, 1 nov. 2015.

RODRIGUES, M. S. et al. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 6587–6592, 2011.

ROJA, K. et al. Extraction and characterization of Polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 22, p. 101358, 1 nov. 2019.

ROSTKOWSKI, K. H. *Understanding methanotrophic polyhydroxybutyrate (phb) production across scale: life cycle assessment, pure culture experimentation, and pathway/genome database development*. Thesis, Stanford University, 2012.

ROUT, P. R.; BHUNIA, P.; DASH, R. R. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous from domestic wastewater using *Bacillus cereus* GS-5 strain exhibiting heterotrophic nitrification, aerobic denitrification and denitrifying phosphorous removal. *Bioresource Technology*, v. 244, n. 1, p. 484–495, nov. 2017.

SABARINATHAN, D. et al. Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics in Medicine Unlocked*, v. 11, p. 61–67, 1 jan. 2018.

SALBITANI, G.; CARFAGNA, S. Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability*, v. 13, n. 2, p. 956, 2021.

SANKARAN, K.; PREMALATHA, M. Nutrients uptake from anaerobically digested distillery wastewater by *Spirulina* sp. under xenon lamp illumination. *Journal of Water Process Engineering*, v. 25, p. 295–300, 2018.

SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. *Spirulina platensis* – food for future: a review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v. 4, n. 1, p. 26-33, 2014.

SARATALE, R. G. et al. Efficient bioconversion of sugarcane bagasse into Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Lysinibacillus* Sp. and its characterization. *Bioresource Technology*, v. 324, p. 124673, 1 mar. 2021.

SAYEDIN, F. et al. Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for nutrient recovery and bioproduct production. *Algal Research*, v. 47, p. 101867, 1 may. 2020.

SCHELIGA, C. G.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; CALDERARI, M. R. Evaluation of strategies to enhance ammoniacal nitrogen tolerance by cyanobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 1, p. 7, 27 nov. 2021.

SCOTT JONES, J. Learn to use bartlett's test of homogeneity of variances in r with data from the general social survey. *SAGE Publications*, v. 2, p. 1-13, 2019.

SEKINE, M. et al. Microalgae cultivation using undiluted anaerobic digestate by introducing aerobic nitrification–desulfurization treatment. *Water Science and Technology*, v. 82, n. 6, p. 1070–1080, 3 abr. 2020.

SENA, M. et al. Environmental impacts of phosphorus recovery through struvite precipitation in wastewater treatment. *Journal of Cleaner Production*, v. 280, p. 124222, jan. 2021.

SHAO, Y. et al. Impacts of ammonium loading on nitrification stability and microbial community dynamics in the integrated fixed-film activated sludge sequencing batch reactor (IFAS-SBR). *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 133, p. 63–69, 1 set. 2018.

SHEN, Y. et al. Free ammonia is the primary stress factor rather than total ammonium to *Chlorella sorokiniana* in simulated sludge fermentation liquor. *Chemical Engineering Journal*, v. 397, p. 125490, 1 out. 2020.

SHEVELA, D.; PISHCHALNIKOV, R. Y.; EICHACKER, L. A. *Oxygenic photosynthesis in cyanobacteria*. [s.l.] CRC Press Boca Raton, p. 3-40, 2013.

SINGH, A. K. et al. Progress and challenges in producing Polyhydroxyalkanoate biopolymers from Cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 3, p. 1213–1232, 1 jun. 2017.

SINGH, A. K.; MALLICK, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. *FEMS Microbiology Letters*, v. 364, n. 20, 2017.

SINGH, G.; PATIDAR, S. K. Microalgae harvesting techniques: A Review. *Journal of Environmental Management*, v. 217, p. 499–508, 1 jul. 2018.

SINGH SAHARAN, B.; GREWAL, A.; KUMAR, P. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: A review on trends and latest developments. *Chinese Journal of Biology*, v. 2014, p. e802984, 24 fev. 2014.

SMITH, A. M.; MOXON, S.; MORRIS, G. A. Biopolymers as wound healing materials. *Wound healing biomaterials*, v. 2, p. 261–287, 2016.

SOLETTI, D. et al. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, v. 243, p. 217–224, 2005.

SONEGO, J. L. S. et al. Optimization of fed-batch fermentation with in situ ethanol removal by CO<sub>2</sub> stripping. *Energy & Fuels*, v. 32, n. 1, p. 954–960, 18 jan. 2018.

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

TAMANG, P. et al. Comparative study of polyhydroxyalkanoates production from acidified and anaerobically treated brewery wastewater using enriched mixed microbial culture. *Journal of Environmental Sciences*, v. 78, p. 137–146, 1 abr. 2019.

TAMIS, J. et al. Enrichment of *Plasticicumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *Journal of Biotechnology*, v. 192, p. 161–169, 20 dez. 2014.

THAKUR, S. et al. Recent developments in recycling of polystyrene based plastics. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 13, p. 32–38, 1 out. 2018.

THORBERGSDÓTTIR, I. M.; GÍSLASON, S. R. Internal loading of nutrients and certain metals in the shallow eutrophic Lake Myvatn, Iceland. *Aquatic Ecology*, v. 38, n. 2, p. 191–208, 2004.

TIAN, H. et al. Acclimation to extremely high ammonia levels in continuous biomethanation process and the associated microbial community dynamics. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 616–623, 1 jan. 2018.

TOH, P. et al. Comparison of polyhydroxyalkonates biosynthesis, mobilization and the effects of cellular morphology in *Spirulina platensis* and *Synechocystis* sp. UNIWG. *J Biosci.* v. 19, n. 2, p. 21–38, 1 jan. 2008.

TRAKUNJAE, C. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 21 jan. 2021.

TROSCHL, C.; MEIXNER, K.; DROSG, B. Cyanobacterial PHA production—Review of recent advances and a summary of three years' working experience running a pilot plant. *Bioengineering*, v. 4, n. 2, p. 26, 28 mar. 2017.

TZANAKAKIS, V. A.; PARANYCHIANAKIS, N. V.; ANGELAKIS, A. N. Water Supply and Water Scarcity. *Water*, v. 12, n. 9, p. 2347, set. 2020.

TZOLLAS, N. M. et al. A new approach to indophenol blue method for determination of ammonium in geothermal waters with high mineral content. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, v. 90, n. 2, p. 115–126, 2010.

VANAPALLI, K. R. et al. 12 - Emissions and environmental burdens associated with plastic solid waste management. *Plastics to Energy*, p. 313–342, 2019.

VELASCO-MUÑOZ, J. F. et al. Sustainable water use in agriculture: A review of worldwide research. *Sustainability*, v. 10, n. 4, p. 1084, abr. 2018.

VERMA, D.; FORTUNATI, E. 1 - Biopolymer processing and its composites: An introduction. *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy* [s.l.] p. 3–23, 2019.

VERNÈS, L. et al. Phycocyanin from *Arthrospira Platensis*. Production, Extraction and Analysis. *Current Biotechnology*, v. 05, p. 1–1, 15 out. 2015.

WANG, L. et al. Acclimation process of cultivating *Chlorella vulgaris* in toxic excess sludge extract and its response mechanism. *The science of the total environment*, v. 628–629, p. 858–869, 1 jul. 2018.

WANG, Q.; PRASAD, R.; HIGGINS, B. Aerobic bacterial pretreatment to overcome algal growth inhibition on high-strength anaerobic digestates. *Water Research*, v. 162, n.1, p. 420-426, jul. 2019.

WIJESINGHE, D. T. N. *Enhancement of methane generation by reducing nitrogen concentration during anaerobic digestion of swine manure*, Thesis, University of Melbourne, 2017.

WIJFFELS, R. H.; KRUSE, O.; HELLINGWERF, K. J. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, Energy biotechnology • Environmental biotechnology. v. 24, n. 3, p. 405–413, 1 jun. 2013.

WU, G. et al. Review of characteristics of anammox bacteria and strategies for anammox start-up for sustainable wastewater resource management. *Water Science and Technology*, v. 82, n. 9, p. 1742–1757, 17 set. 2020.

ZENG, D. et al. Nitrogen removal, microbial community and electron transport in an integrated nitrification and denitrification system for ammonium-rich wastewater treatment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 133, p. 202–209, 1 set. 2018.

ZHAI, J. et al. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. *Ecological Engineering*, v. 108, p. 83–92, 2017.

ZHANG, F. et al. A novel simultaneous partial nitrification anammox and denitrification (SNAD) with intermittent aeration for cost-effective nitrogen removal from mature landfill leachate. *Chemical Engineering Journal*, v. 313, p. 619–628, 1 abr. 2017.

ZHANG, Y.Z. et al. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) from glucose. *Journal of Biotechnology*, v. 195, p. 82–88, 10 fev. 2015.

ZHAO, Y. et al. Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 42, n. 4, p. 593–602, abr. 2019.

ZHOU, T. et al. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, v. 269, p. 285–291, 1 dez. 2018.

## APÊNDICE A - Avaliação da produção de polihidroxialcanoatos em diferentes composições de luz por *Arthrospira platensis*

Durante o início do desenvolvimento do presente estudo, lidou-se com a elevada sensibilidade das cianobactérias aos compostos amoniacais e, até então, não tinham sido avaliadas estratégias para lidar com a toxicidade do nitrogênio amoniacal para as mesmas. Nesse sentido, buscou-se focar em estratégias para aumentar a produção de biopolímeros (polihidroxialcanoatos) por *A. platensis*. Nesse momento do estudo também não havia certeza quanto ao aumento do acúmulo de biopolímeros pelas cianobactérias através da inserção de glicerol bruto residual de biodiesel. Diante disso, buscou-se estratégias como a avaliação da produção de biopolímeros por *A. platensis* diferentes composições de luz.

Como são microrganismos fotossintetizantes, a densidade de fluxo fotônico (D.F.F), assim como a qualidade espectral da luz utilizada no cultivo, são importantes variáveis que interferem no crescimento e produção de metabólitos. Ainda assim, há poucos estudos relacionados à influência da variação desses parâmetros na produção de cianobactérias, não sendo encontrados estudos dessa influência para produção de PHA (LIMA et al., 2018; COSTA et al., 2019).

Além disso, outro fator motivador foi haver diferenças entre a condição ideal para produção de biomassa celular (com maior disponibilidade de nutrientes) daquela para o acúmulo de polihidroxialcanoatos (com quantidades limitantes de nitrogênio, por exemplo). Isso faz com que, em geral, teores significativos de PHA possam ser alcançados em baixas concentrações celulares. Baseando-se nisso, nesse momento do estudo, foi avaliada a estratégia da produção de PHA em batelada sequencial (SBR), em que a maximização da produção de biomassa e de PHA ocorre em diferentes estágios e reatores. No estágio de crescimento, aumenta-se a disponibilidade de nutrientes, objetivando-se a obtenção de concentrações elevadas em biomassa celular (KAMRAVAMANESH et al., 2018).

Após a transferência das células produzidas na primeira etapa para o estágio de indução, com concentrações limitantes de determinados nutrientes, esperou-se obter elevadas concentrações de células com teor satisfatório de PHA. Em relação as condições experimentais utilizadas nessa fase do estudo, a cianobactéria *A. platensis* foi mantida em meio Zarrouk modificado por George (1976) seguindo as mesmas condições do Item 3.1. Avaliou-se a

produção de *Arthrospira platensis* em diferentes densidades de fluxo fotônico e espectro de emissão da fonte luminosa utilizada.

Para obtenção de diferentes espectros de emissão foram utilizados *light-emitting diodes* (LED) branco e rosa. Além disso, experimentos em etapa única, em meio Zarrouk com nitrato de sódio (batelada simples), foram comparados aos conduzidos por batelada sequencial (em duas etapas). Nos experimentos em duas etapas, a primeira etapa foi realizada em meio Zarrouk contendo nitrato de sódio, visando estimular a produção de biomassa. Após a obtenção de concentrações favoráveis em biomassa, as células foram transferidas para meio Zarrouk sem nitrato de sódio, após terem sido filtradas em tela de Nylon (5  $\mu\text{m}$ ), sob condições assépticas em capela de fluxo laminar. Um resumo das condições experimentais utilizadas pode ser observado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- Resumo das condições experimentais para produção de *A. platensis* em diferentes composições de luz

Condição experimental	Modo de condução	D.F.F (fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Tipo de LED (primeiro estágio)	Tipo de LED (segundo estágio)	Fonte de nitrogênio (primeiro estágio)	Fonte de nitrogênio (segundo estágio)
I	Batelada sequencial (SBR)	305 $\pm$ 18	Rosa	Branco	Nitrato de sódio	Ausente
II	Batelada sequencial (SBR)	149 $\pm$ 1	Rosa	Branco	Nitrato de sódio	Ausente
III	Batelada sequencial (SBR)	93 $\pm$ 1	Rosa	Branco	Nitrato de sódio	Ausente
IV	Batelada sequencial (SBR)	395 $\pm$ 2	Branco	Branco	Nitrato de sódio	Ausente
V	Batelada simples	330 $\pm$ 22	Rosa	Estágio único	Nitrato de sódio	Estágio único
VI	Batelada simples	399 $\pm$ 7	Branco	Estágio único	Nitrato de sódio	Estágio único

Fonte: O autor, 2022.

Os cultivos foram realizados em volume útil de 4 L para cada ensaio realizado. Foram, então, utilizadas condições baseadas em Dos Santos et al. (2019). Os cultivos realizados, como também aqueles realizados para produção de suspensão celular a ser utilizada como inóculo, foram feitos em recipientes transparentes de plástico (polietileno tereftalato) de volume 5 L e

volume útil de 4 L. A concentração inicial de células para produção de inóculo foi próxima a  $0,13 \text{ g.L}^{-1}$ . Os cultivos foram mantidos em temperatura média de  $24^\circ\text{C}$  e sob aeração constante com ar atmosférico filtrado, suprido por compressores de ar para aquário.

Os experimentos em LED rosa foram mantidos em iluminação constante por lâmpadas de LED rosa Ce ROHS, Modelo Painei, 18 W. Foram avaliadas 3 densidades de fluxo fotônico em duplicata. Os experimentos na condição em LED branco foram iluminados por lâmpadas de LED branca tipo Plafon ( $20\text{cm} \times 20 \text{ cm}/18\text{V}$ ). Obteve-se tais valores de densidade de fluxo fotônico por medição por um dosímetro (Biospherical Instrument, QSL 2100), sendo os valores expressos em fótons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

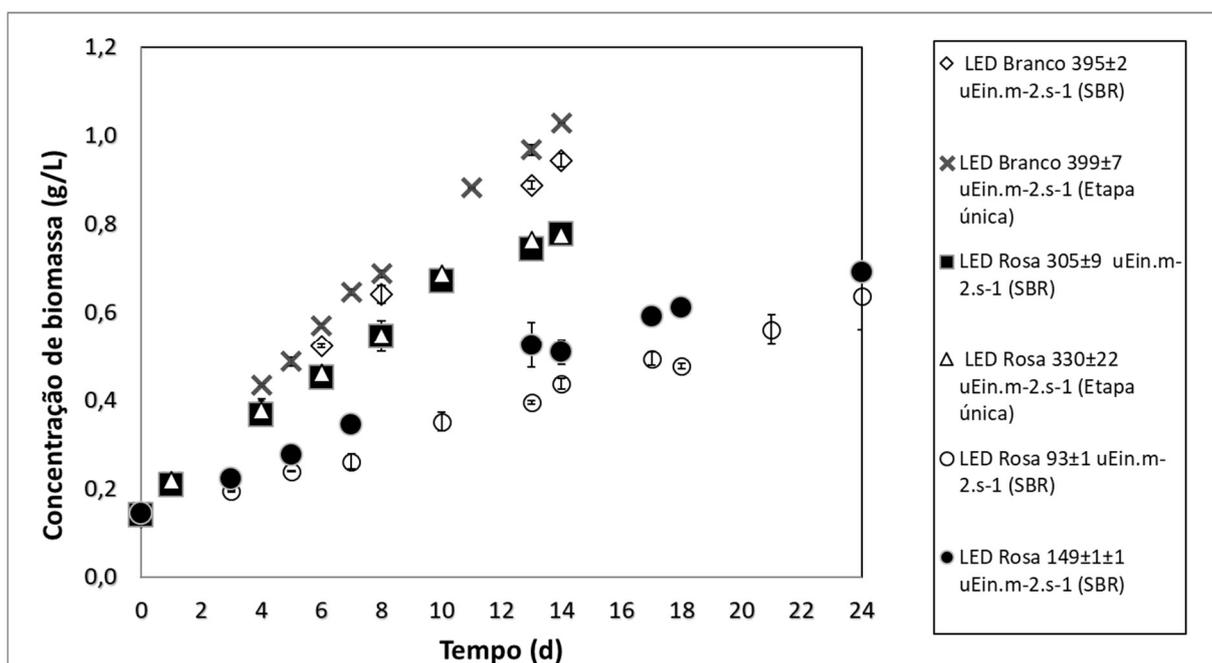
Ao fim do cultivo, as suspensões celulares foram filtradas em tela de Nylon de  $5 \mu\text{m}$  para recuperação da biomassa e posterior congelamento e liofilização. As análises para quantificação de polihidroxicanoatos foram, então, realizadas com as biomassas liofilizadas. Utilizou-se os métodos analíticos para determinação da concentração de biomassa, produtividade volumétrica em biomassa e polihidroxicanoatos descritos no Item 3 do presente estudo.

Esse experimento consistiu em avaliar a possibilidade de se obter um teor relevante em PHA na biomassa de *Arthrospira platensis* pela estratégia de cultivo em duas etapas. O intuito foi induzir a produção dos biopolímeros pela cianobactéria através do stress celular pela mudança, entre as etapas, da qualidade espectral da luz, da DFF, além do stress metabólico pela ausência da fonte de nitrogênio no meio de cultivo durante a segunda etapa. A ideia seria integrar essa estratégia, nas etapas futuras, ao uso de fontes amoniacais presentes em efluentes, que poderia ser inserido na primeira etapa de produção de células, já que concentrações maiores de fontes nitrogenadas são necessárias nesta primeira etapa. Havia também a possibilidade da ficocianina produzida na etapa de crescimento (1ª. Etapa) servir como um repositório de carbono para a síntese de PHA na etapa de indução de stress metabólico (2ª etapa), visto que a mesma é a principal proteína produzida em *Arthrospira platensis*.

O Gráfico 23 mostra o crescimento de *Arthrospira platensis* em diferentes DFF, em LED rosa e LED branco, na primeira etapa de cultivo (em meio com nitrato de sódio). Percebe-se que nos ensaios com maior densidade de fluxo fotônico houve maior crescimento de *Arthrospira platensis*, ou seja, maior produção de biomassa em menor tempo. Após cada suspensão ter alcançado um determinado nível de crescimento, houve transferência da biomassa para o meio sem nitrato de sódio, onde o cultivo foi estendido por cinco dias. No caso do cultivo em LED rosa de DFF de  $305,42 \pm 18,27$  fótons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e do cultivo em LED branco esta

transferência foi realizada no 14º dia de cultivo. Nos demais cultivos, foi feita a transferência no 24º dia de cultivo.

Gráfico 23 – Cultivos de *A. platensis* conduzidos por batelada sequencial (primeiro estágio) e por batelada simples e em diferentes D.F.F e diferentes qualidades espectrais de luz (LED branco e rosa).



Fonte: O autor, 2022.

Na Tabela 4.10 é possível observar que a produtividade em biomassa é diretamente influenciada pela DFF; o que corrobora com os resultados observados por Ho et al. (2018) em que notam a maior produtividade em biomassa por *Spirulina platensis* em densidades de fluxo fotônico próximas a  $400 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . No entanto, a influência da DFF e da qualidade espectral da luz utilizada no cultivo desta espécie, para produção de PHA, ainda é pouco estudada.

Lehmuskero, Chauton e Boström (2018) enfatizaram a importância da intensidade luminosa como fator influente para o crescimento de microalgas. Expõe que se a intensidade de luz é muito baixa, a taxa de consumo das fontes de carbono durante a respiração celular é maior, comprometendo a disponibilidade dessas fontes para indução das vias de síntese que culminam na produção de biomassa. Sendo, os polihidroxialcanoatos compostos de reserva energética, seu acúmulo poderia ser comprometido em baixas intensidades luminosas, como está sendo

indicado nesse estudo (Tabela 4.11); porém, ainda falta determinar o teor em PHA na biomassa obtida no cultivo com a menor DFF utilizada, não sendo, portanto, ainda conclusivos os resultados da Tabela 4.10.

Tabela 4.11 – Resultados da produção de biomassa e PHA por *A. platensis* por batelada sequencial (em dois estágios) em LED rosa e branco.

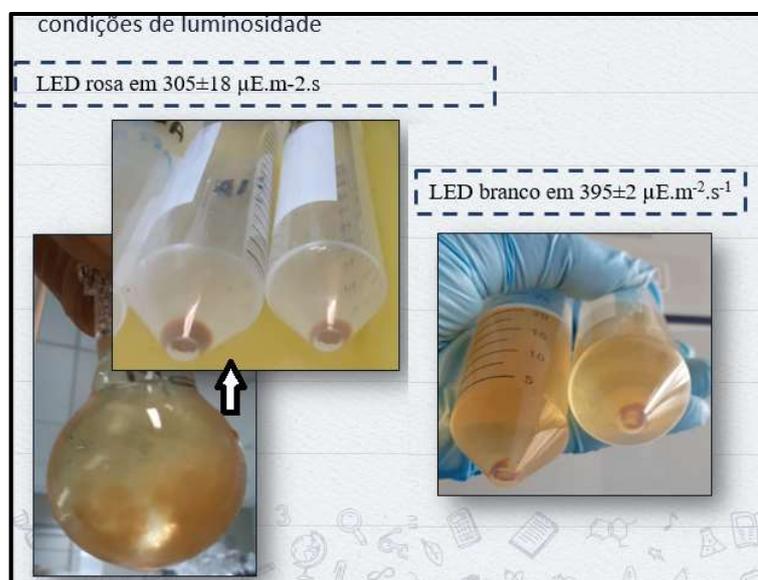
Densidade de fluxo fotônico	Produtividade em Biomassa (g.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	PHA (mg.g <sup>-1</sup> )
LED branco em 395 fótons m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	0,04740±0,005	14,9±3,5
LED rosa em 305 fótons m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	0,0453±0,008	12,4±0,8
LED rosa em 149 fótons m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	0,0220±0,0012	4,15±1,84
LED rosa em 112 fótons m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup>	0,01461±0,001	Em análise

Fonte: O autor, 2022.

Percebe-se, mediante a análise da Tabela 4.10, a pouca diferença entre o acúmulo de PHA entre a biomassa que sofreu a mudança da qualidade espectral de LED rosa para branco e entre a biomassa cultivada somente em LED branco. No entanto, mediante a análise da Figura 24, o precipitado contendo o polímero extraído da biomassa que sofreu a mudança da qualidade espectral foi maior do que o obtido pela biomassa cultivada somente em uma qualidade espectral de luz. Ainda que tenha havido um aumento visual, a baixa produção dos biopolímeros pela *A. platensis*, nessas condições e em autotrofia, talvez tenha influenciado na sensibilidade da metodologia para quantificação dos PHA.

Mesmo que esse resultado tenha sido um possível indicativo da influência da mudança da qualidade espectral da luz para os compostos produzidos por *A. platensis*, optou-se, posteriormente, pela tentativa do aumento da produção dos PHA por mixotrofia, a partir da inserção, no meio de produção, do glicerol bruto coproduto da produção de biodiesel, como foi discutido, previamente, no presente estudo.

Figura 24- Aspecto dos biopolímeros extraídos de *A. platensis* em cultivos conduzidos por batelada sequencial (SBR) em diferentes composições de luz



Legenda: A esquerda são os polímeros extraídos da biomassa cultivada em mudança da qualidade espectral de rosa para branco durante os dois estágios (de produção de biomassa, em LED rosa, e de indução da produção de PHA, em LED branco). A direita ilustra os biopolímeros extraídos na biomassa produzida somente em LED branco nos dois estágios.

Fonte: O autor, 2022.

**APÊNDICE B** -Análises estatísticas realizadas para interpretação dos resultados do presente estudo

**Comparação do cultivo de cianobactérias em diferentes concentrações de nitrogênio amoniacal**

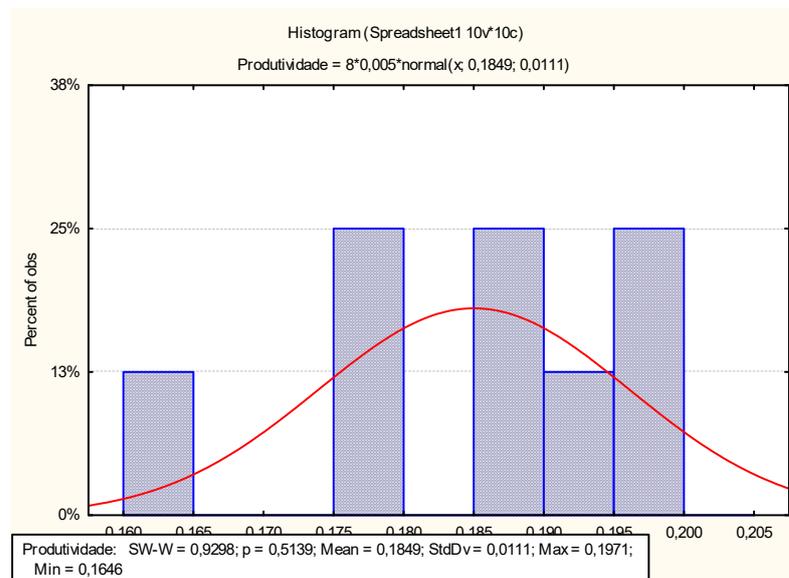
A seguir encontram-se as análises estatísticas dos dados da Tabela 4.1

## Parâmetro: produtividade em biomassa $Q_x$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) por *Arthrospira platensis*

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 24 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Todos os dados analisados apresentaram a mesma cor e diferenças não significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 25 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa por *A. platensis*

		{1}	{2}	{3}	{4}
Cell No.		,17535	,17771	,19694	,18951
1	NS 0,25		0,988598	0,149268	0,375831
2	NS 0,128	0,988598		0,199485	0,498979
3	SA 0,194	0,149268	0,199485		0,775797
4	SA 0,147	0,375831	0,498979	0,775797	

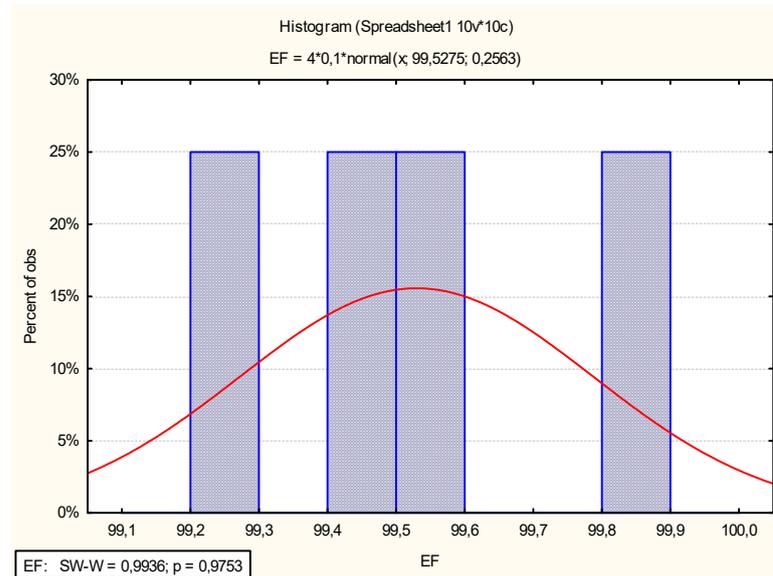
Fonte: O autor, 2022.

### **Eficiência de remoção de N amoniacal por *Arthrospira platensis***

#### **Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 26 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Arthrospira platensis*



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

A análise sugere que as médias de eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal em 0,194 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio e 0,147 g.L<sup>-1</sup> dessa mesma fonte de nitrogênio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Não foram adicionados nessa análise os dados em 0,5 g.L<sup>-1</sup> de nitrogênio amoniacal por não ter havido crescimento da microalga nem consumo de nitrogênio amoniacal.

Gráfico 27 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Arthrospira platensis*

Cell No.	Condição	{1}	{2}
1	SA 0,194	99,645	99,410
2	SA 0,147	0,470874	0,470874

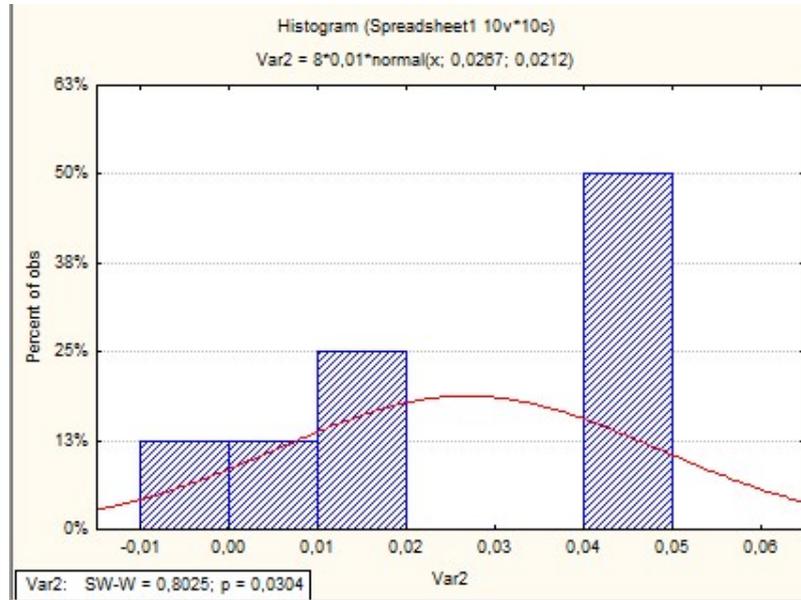
Fonte: O autor, 2022.

### Produtividade em biomassa Qx (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) por *Synechocystis* D202

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 28 – Teste de Normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa Qx ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) por *Synechocystis* D202



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 29 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa Qx ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) por *Synechocystis* D202

Tests of Homogeneity of Variances (PRODUTIVIDADE SYNECO)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
<b>Var2</b>		0,680233	1,646718	2	0,438955

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

## Teste de Tukey

Os dados em negrito sugerem que há diferença significativa entre a produtividade em biomassa dos cultivos realizados em 0,147 e 0,194 g.L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio. Além disso, os controles realizados em nitrato de sódio (0,128 e 0,25 g.L<sup>-1</sup>) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Gráfico 30 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa Qx (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) por *Synechocystis* D202

		Tukey HSD test; Variable: Prod (produtividade)			
		Marked differences are significant at p < ,0500			
Cod.		{1}	{2}	{3}	{4}
		M=,04450	M=,01500	M=,00400	M=,04750
128	{1}		<b>0,000641</b>	<b>0,000311</b>	0,764880
147	{2}	<b>0,000641</b>		<b>0,037999</b>	<b>0,000479</b>
194	{3}	<b>0,000311</b>	<b>0,037999</b>		<b>0,000293</b>
250	{4}	0,764880	<b>0,000479</b>	<b>0,000293</b>	

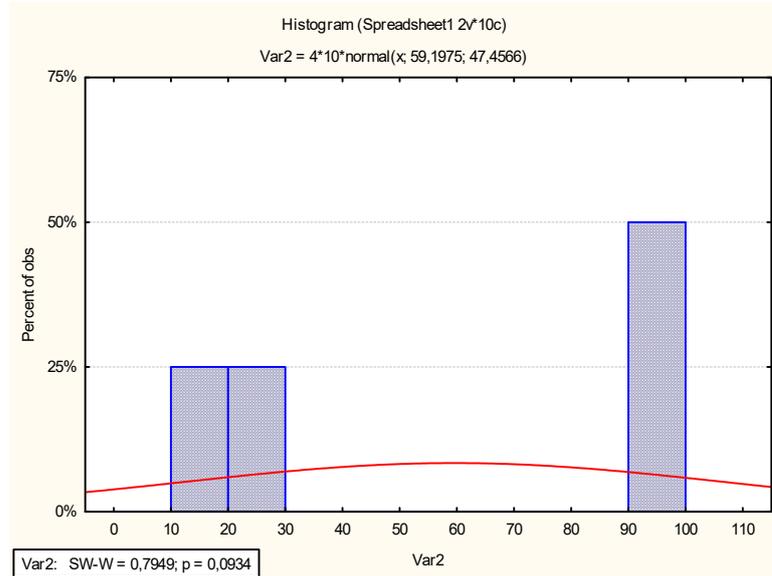
Fonte: O autor, 2022.

## Eficiência de remoção de N amoniacal por *Synechocystis* D202

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 31 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Synechocystis* D202



Fonte: O autor, 2022.

**Teste de Tukey**

Os dados em **negrito** sugerem que há diferença significativa entre a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal nos cultivos em **0,147** e **0,194** g.L-1 de sulfato de amônio.

Gráfico 32 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Synechocystis* D202

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = 48,511, df = 2,0000				
Cell No.	Var1	{1}	{2}	
		100,00	<b>18,395</b>	
1	147		<b>0,007487</b>	
2	194	<b>0,007487</b>		

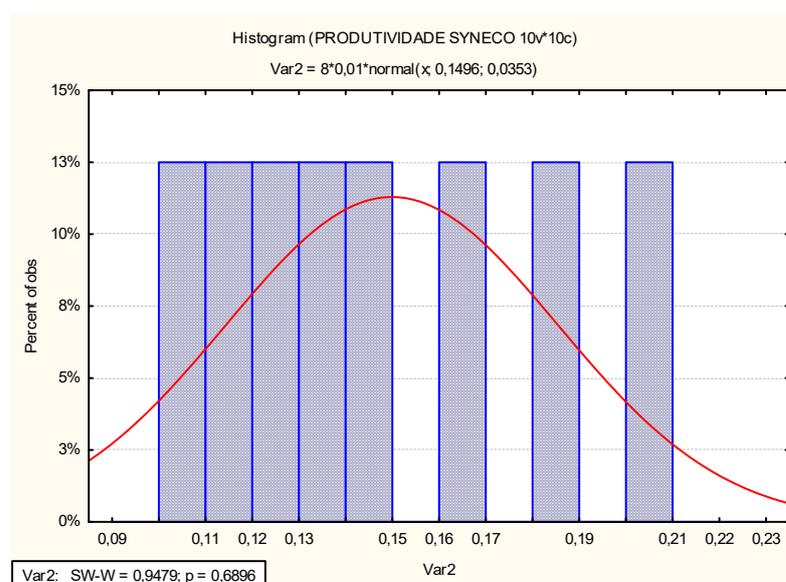
Fonte: O autor, 2022

## Produtividade em biomassa $Q_x$ ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) por *Spirulina labyrinthiformis*

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 33 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa  $Q_x$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) por *Spirulina labyrinthiformis*



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os dados em **negrito** apresentam diferenças estatisticamente significativas. Não houve diferenças da produtividade em biomassa dos ensaios controle. Os ensaios nas diferentes concentrações de sulfato de amônio apresentaram diferenças significativas quanto a produtividade em biomassa.

Gráfico 34 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa Qx (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) por *Spirulina labyrinthiformis*

Tukey HSD test; variable Var2 (PRODUTIVIDADE SY)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,00018, df = 4,0000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		,11347	,15700	,19735	,13047
1	NS 0,25		0,100938	<b>0,011714</b>	0,626768
2	NS 0,128	0,100938		0,124825	0,331229
3	SA 0,194	<b>0,011714</b>	0,124825		<b>0,025887</b>
4	SA 0,147	0,626768	0,331229	<b>0,025887</b>	

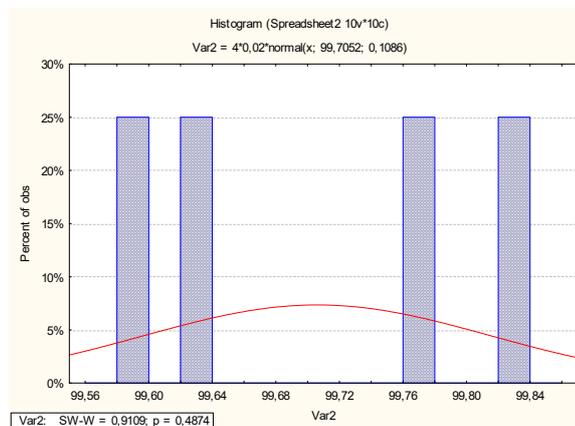
Fonte: O autor 2022.

**Eficiência de remoção de N amoniacal por *Spirulina labyrinthiformis***

**Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 35 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Spirulina labyrinthiformis*



Fonte: O autor, 2022.

## Teste de Tukey

Os resultados sugerem que não houve diferença estatisticamente significativa entre as eficiências de remoção do nitrogênio amoniacal em 0,147 e 0,194 g.L-1 de sulfato de amônio.

Gráfico 36 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de N amoniacal por *Spirulina labyrinthiformis*

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet2)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,01664, df = 2,0000					
Var1	{1}	{2}			
	99,728	99,682			
147		0,757309			
194	0,757309				

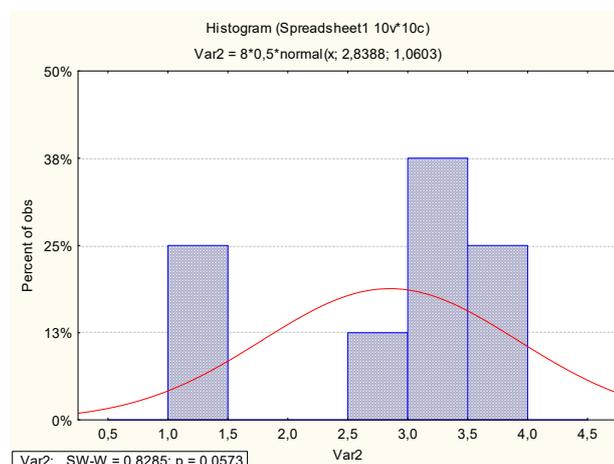
Fonte: O autor, 2022.

## Produção de carotenoides totais por *A. platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em fontes amoniacais (Gráfico 7)

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 37 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro produção de carotenoides totais por *A. platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em fontes amoniacais



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os dados em negrito apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as condições. Onde SP e SL são *A. platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* respectivamente e SA é sulfato de amônio. Logo, a legenda SP 0147 SA, por exemplo, significa cultivo de *A. platensis* em 0,147 g.L-1 de sulfato de amônio.

Gráfico 38 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produção de carotenoides totais por *A. platensis* e *Spirulina labyrinthiformis* em fontes amoniacais

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,00781, df = 4,0000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		1,2250	3,0100	3,9100	3,2100
1	SP 0147 SA		<b>0,000364</b>	<b>0,000293</b>	<b>0,000319</b>
2	SP 0194 SA	<b>0,000364</b>		<b>0,001996</b>	0,249875
3	SL 0147 SA	<b>0,000293</b>	<b>0,001996</b>		<b>0,004931</b>
4	SL 0194 SA	<b>0,000319</b>	0,249875	<b>0,004931</b>	

Fonte: O autor, 2022.

**Comparação de estratégias para melhor aproveitamento do nitrogênio amoniacal por *Arthrospira platensis*: aumento de inóculo e aclimatação celular**

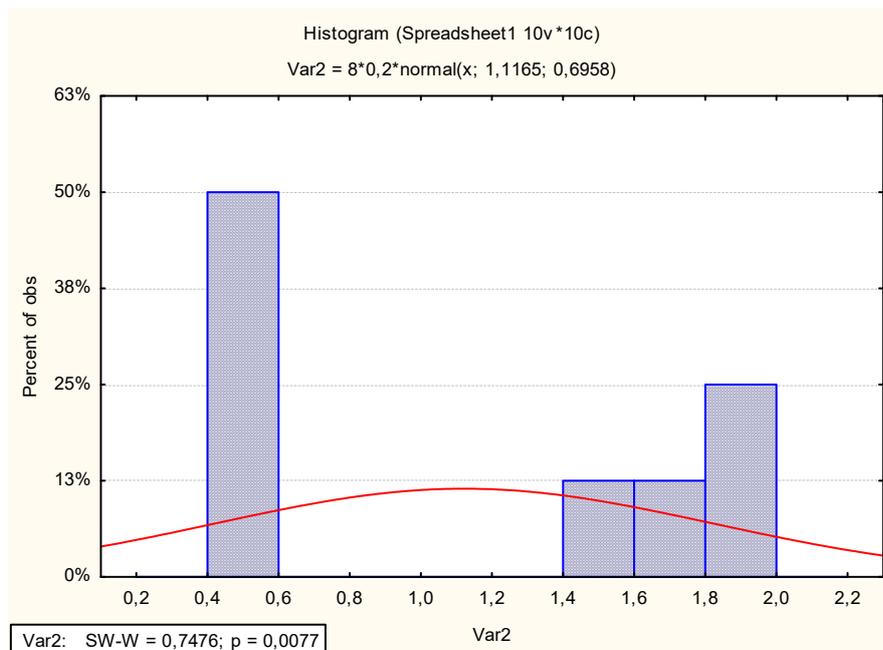
Análise dos resultados da Tabela 4.3

**Parâmetro: Concentração final de biomassa, X (g.L<sup>-1</sup>).**

**Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 39 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, X (g.L<sup>-1</sup>) por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi maior superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

Gráfico 40 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, X (g.L<sup>-1</sup>) por *A. platensis*

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)						
Effect: "Var1"						
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p	
<b>Var2</b>	<b>210,20971</b>	0,834226	3,686278	3	0,297394	

Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os valores em negrito são estatisticamente distintos. As duas primeiras linhas da tabela são os ensaios com a biomassa aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As duas últimas linhas são os ensaios com a biomassa não aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Gráfico 41 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração final de biomassa, X (g.L<sup>-1</sup>) por *A. platensis*

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)				
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests				
Error: Between MS = ,00147, df = 4,0000				
Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
	,48563	1,6424	,45783	<b>1,8803</b>
BIOMASSA ACLIM 02		<b>0,000293</b>	0,883216	<b>0,000291</b>
BIOMASSA ACLIM 05	<b>0,000293</b>		<b>0,000293</b>	<b>0,011968</b>
BIOMASSA N-ACLIM 02	0,883216	<b>0,000293</b>		<b>0,000291</b>
BIOMASSA N-ACLIM 05	<b>0,000291</b>	<b>0,011968</b>	<b>0,000291</b>	

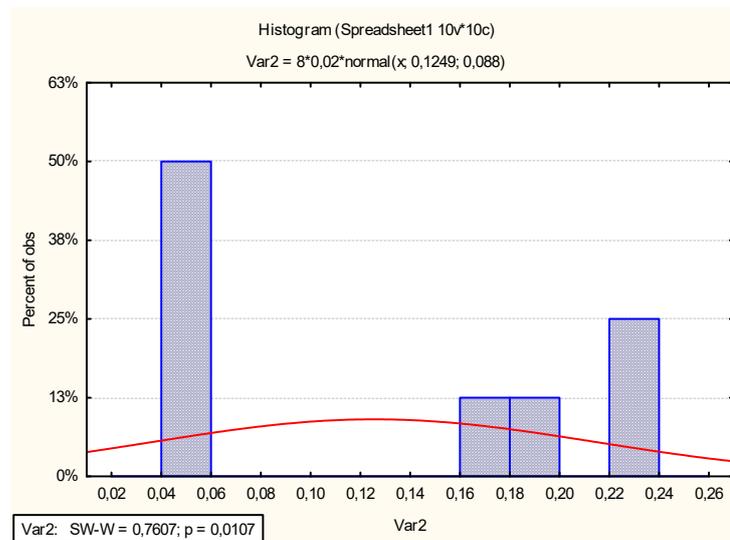
Fonte: O autor, 2022.

**Parâmetro: Produtividade em biomassa,  $Q_x$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ).**

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 42 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Produtividade em biomassa,  $Q_x$  ( $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) de *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

O valor de  $p$  foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

Gráfico 43 – Teste de homogeneidade entre as variâncias dos dados do parâmetro produtividade em biomassa,  $Q_x$  (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) de *A. platensis*

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
<b>Var2</b>	<b>191,36111</b>	0,839584	3,769776	3	0,287421

Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os valores em negrito são estatisticamente distintos. As duas primeiras linhas da tabela são as produtividades em biomassa dos ensaios com a biomassa aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As duas últimas linhas são os ensaios com a biomassa não aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Gráfico 44 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produtividade em biomassa,  $Q_x$  (g.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) de *A. platensis*

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,00004, df = 4,0000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
1	BIOMASSA ACLIM 02	,04475	,18700	,04290	<b>,22500</b>
2	BIOMASSA ACLIM 05	<b>0,000321</b>		<b>0,000318</b>	<b>0,013943</b>
3	BIOMASSA N-ACLIM 02	0,990420	<b>0,000318</b>		<b>0,000295</b>
4	BIOMASSA N-ACLIM 05	<b>0,000295</b>	<b>0,013943</b>	<b>0,000295</b>	

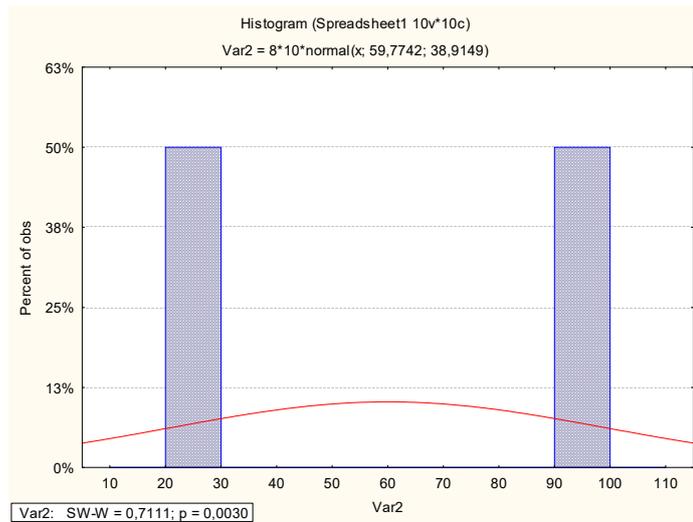
Fonte: O autor, 2022.

**Parâmetro: Eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%)**

**Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 45 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%), por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 46 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%), por *A. platensis*

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
<b>Var2</b>	<b>47,58605</b>	<b>0,378569</b>	<b>1,854813</b>	<b>3</b>	<b>0,603080</b>

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

### Teste de Tukey

Os valores em negrito são estatisticamente distintos. As duas primeiras linhas da tabela são as eficiências de remoção do N-amoniaco dos ensaios com a biomassa aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. As duas últimas linhas são os ensaios com a biomassa não aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Gráfico 47 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro eficiência de remoção de N-amoniaco, EF (%), por *A. platensis*

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,66892, df = 4,0000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		23,298	99,674	23,634	92,490
1	BIOMASSA ACLIM 02		<b>0,000291</b>	0,973803	<b>0,000291</b>
2	BIOMASSA ACLIM 05	<b>0,000291</b>		<b>0,000291</b>	<b>0,003380</b>
3	BIOMASSA N-ACLIM 02	0,973803	<b>0,000291</b>		<b>0,000291</b>
4	BIOMASSA N-ACLIM 05	<b>0,000291</b>	<b>0,003380</b>	<b>0,000291</b>	

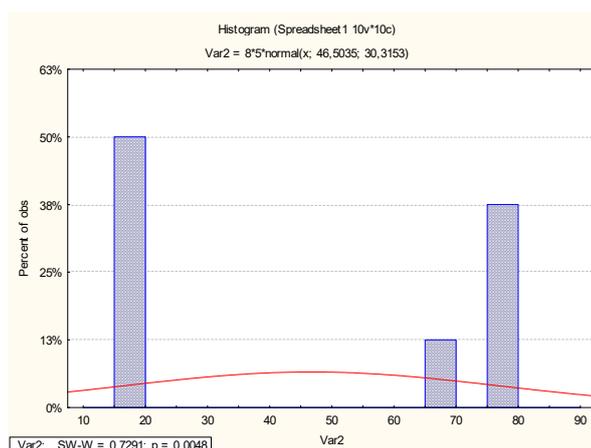
Fonte: O autor, 2022.

**Parâmetro: Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L<sup>-1</sup>).**

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 48 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L<sup>-1</sup>) por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 49 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L<sup>-1</sup>) por *A. platensis*

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Var2	395,7614	0,944036	5,526795	3	0,137045

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

### Teste de Tukey

Os valores em negrito são estatisticamente distintos. As duas primeiras linhas da tabela são as concentrações de nitrogênio amoniacal consumidas nos ensaios com a biomassa aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L-1, respectivamente. As duas últimas linhas são os ensaios com a biomassa não aclimatada e inóculos de 0,2 e 0,5 g.L-1, respectivamente.

Gráfico 50 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Nitrogênio amoniacal consumido (mg.L-1) por *A. platensis*

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 13,214, df = 4,0000					
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}
		18,225	77,994	18,500	71,294
1	BIOMASSA ACLIM 02		<b>0,000489</b>	0,999824	<b>0,000651</b>
2	BIOMASSA ACLIM 05	<b>0,000489</b>		<b>0,000500</b>	0,374192
3	BIOMASSA N-ACLIM 02	0,999824	<b>0,000500</b>		<b>0,000668</b>
4	BIOMASSA N-ACLIM 05	<b>0,000651</b>	0,374192	<b>0,000668</b>	

Fonte: O autor, 2022.

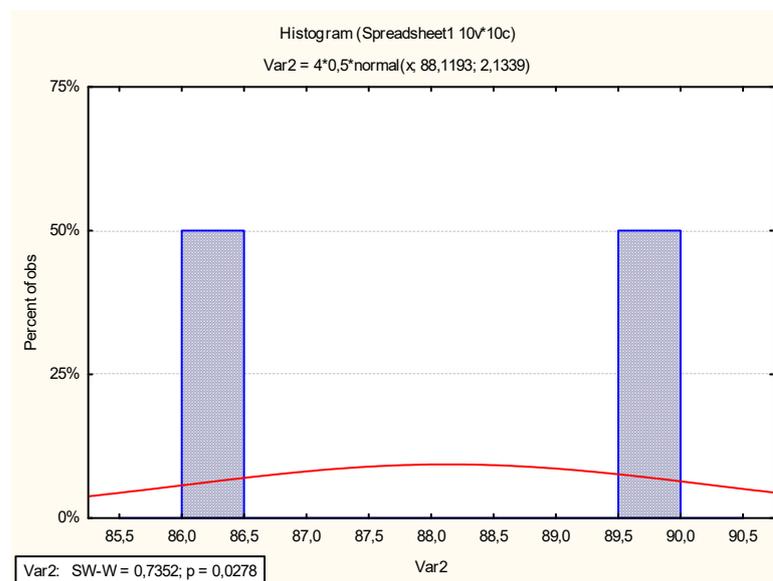
## Parâmetros dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup> (Gráfico 10)

### Parâmetro: Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 51 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 52- Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro Eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Var2	2,413441	0,707040	0,125396	1	0,723254

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste t de Student.

### Teste t de Student

Gráfico 53 – Teste t de Student dos dados do parâmetro eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>

T-tests: Grouping: Cod. (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 CONS BAT ALIM E NORMALIDADE)											
Group 1: 5											
Group 2: 1											
Variable	Mean 5	Mean 1	t-value	df	p	Valid N 5	Valid N 1	Std.Dev. 5	Std.Dev. 1	F-ratio Variances	p Variances
Prod	86,27126	89,96725	-185,167	2	0,000029	2	2	0,023736	0,015279	2,413441	0,728206

Fonte: O autor, 2022.

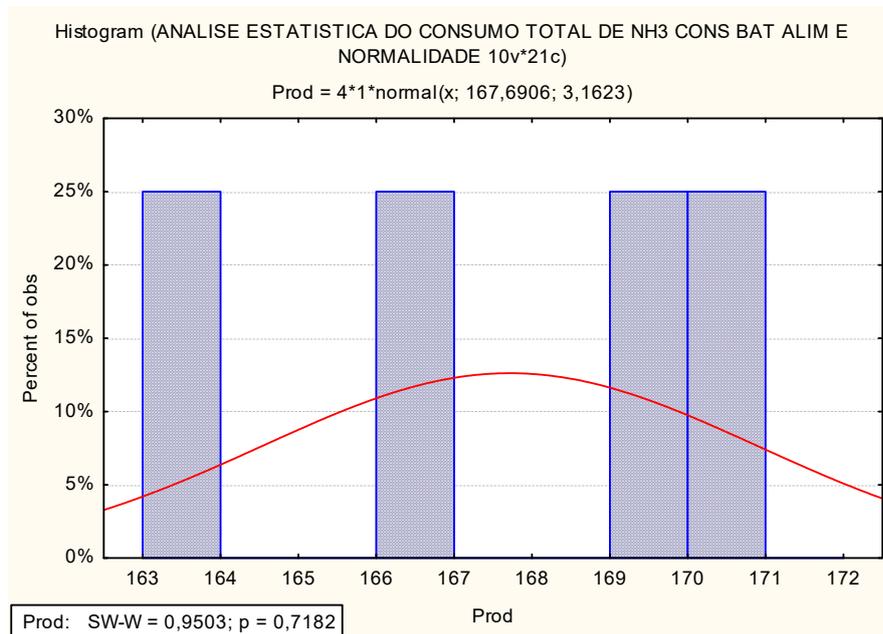
Onde o Cod. 5 é o grupo de experimentos conduzidos por batelada alimentada e inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup> em autotrofia e o Cod. 1 representa o grupo de experimentos realizados nas mesmas condições previamente mencionadas e inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup>. O valor de p, menor que 0,05 indica que o aumento do inóculo, nessas condições, proporcionou diferenças estatisticamente significativas entre a eficiência de remoção de nitrogênio amoniacal.

## Parâmetro: Total de amônia consumida

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de T de Student, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 54 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro total de amônia consumida dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>



Fonte: O autor, 2022.

## Teste t de Student

Onde o Cod. 1 é o grupo de experimentos conduzidos por batelada alimentada e inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup> em autotrofia e o Cod. 5 representa o grupo de experimentos realizados nas mesmas condições previamente mencionadas e inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup>. O valor de p, maior que 0,05 indica que o aumento do inóculo, nessas condições, não proporcionou diferenças estatisticamente significativas entre o consumo total de nitrogênio amoniacal.

Gráfico 55 – Teste t de Student dos dados do parâmetro total de amônia consumida dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>

T-tests; Grouping: Cod. (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 CONS BAT ALIM E NORMALIDADE)  
Group 1: 5  
Group 2: 1

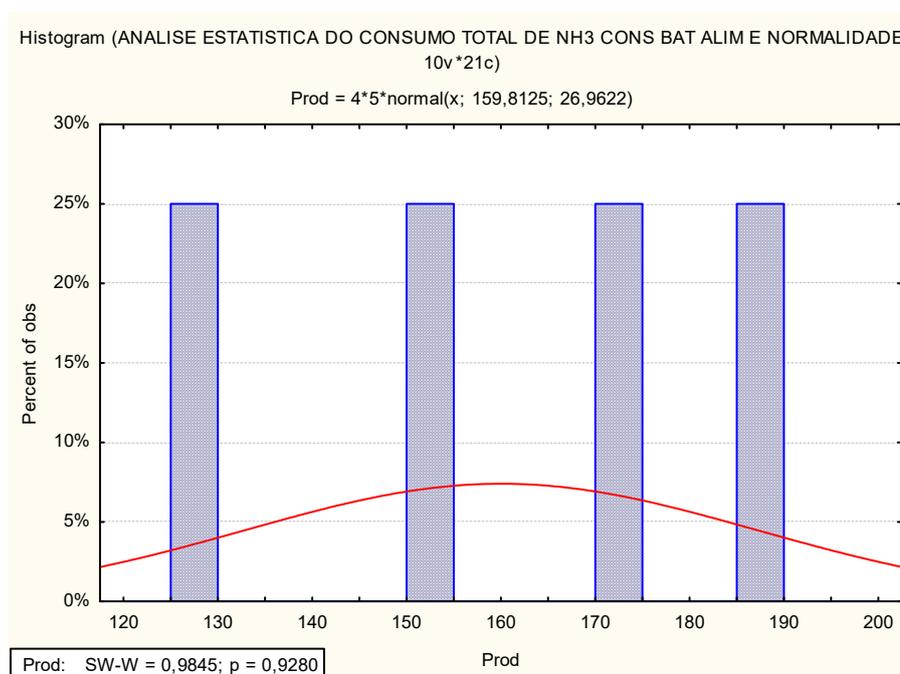
Variable	Mean 5	Mean 1	t-value	df	p	Valid N 5	Valid N 1	Std.Dev. 5	Std.Dev. 1	F-ratio Variances	p Variances
Prod	170,2456	165,1355	3,665413	2	0,067034	2	2	0,899236	1,754607	3,807258	0,603003

## Parâmetro: Ficocianina na biomassa

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de T de Student, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 56 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro ficocianina na biomassa dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

Onde o Cod. 1 é o grupo de experimentos conduzidos por batelada alimentada e inóculo de 0,5 g.L<sup>-1</sup> em autotrofia e o Cod. 5 representa o grupo de experimentos realizados nas mesmas condições previamente mencionadas e inóculo de 1 g.L<sup>-1</sup>. O valor de p, maior que 0,05 indica que o aumento do inóculo, nessas condições, não proporcionou diferenças estatisticamente significativas entre o conteúdo de ficocianina na biomassa.

Gráfico 57 – Teste t de Student dos dados do parâmetro ficocianina na biomassa dos experimentos em batelada alimentada com concentração inicial de biomassa de 0,5 e 1 g.L<sup>-1</sup>

T-tests; Grouping: Cod. (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 CONS BAT ALIM E NORMALIDADE)												
Group 1: 5												
Group 2: 1												
Variable	Mean 5	Mean 1	t-value	df	p	Valid N 5	Valid N 1	Std.Dev. 5	Std.Dev. 1	F-ratio Variances	p Variances	
Prod	139,0993	180,5258	-2,71769	2	0,112919	2	2	18,12418	11,67176	2,411258	0,728468	

Fonte: O autor, 2022.

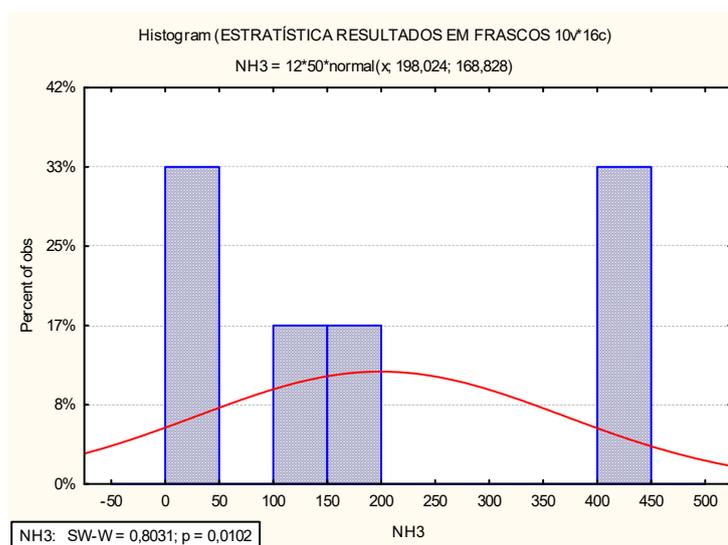
**Avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial (Tabela 4.5)**

**Parâmetro: Total de nitrogênio amoniacal removido**

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 58 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 59 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tests of Homogeneity of Variances (Spreadsheet1)					
Effect: "Var1"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
<b>Var2</b>	<b>711,1111</b>	0,512221	6,158648	5	0,291086

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

### Teste de Tukey

Os dados em **negrito** e *itálico* apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 60 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro total de nitrogênio amoniacal removido do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 41,649, df = 6,0000							
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
		411,22	421,08	164,98	127,56	29,000	34,300
1	GLI/MENOR CONC. NUTR.		0,663444	0,000249	0,000249	0,000249	0,000249
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR.	0,663444		0,000249	0,000249	0,000249	0,000249
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR.	0,000249	0,000249		0,008771	0,000249	0,000249
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR.	0,000249	0,000249	0,008771		0,000259	0,000267
5	ENSAIO N INOC/GLI	0,000249	0,000249	0,000249	0,000259		0,952772
6	ENSAIO N INOC/SEM GLI	0,000249	0,000249	0,000249	0,000267	0,952772	

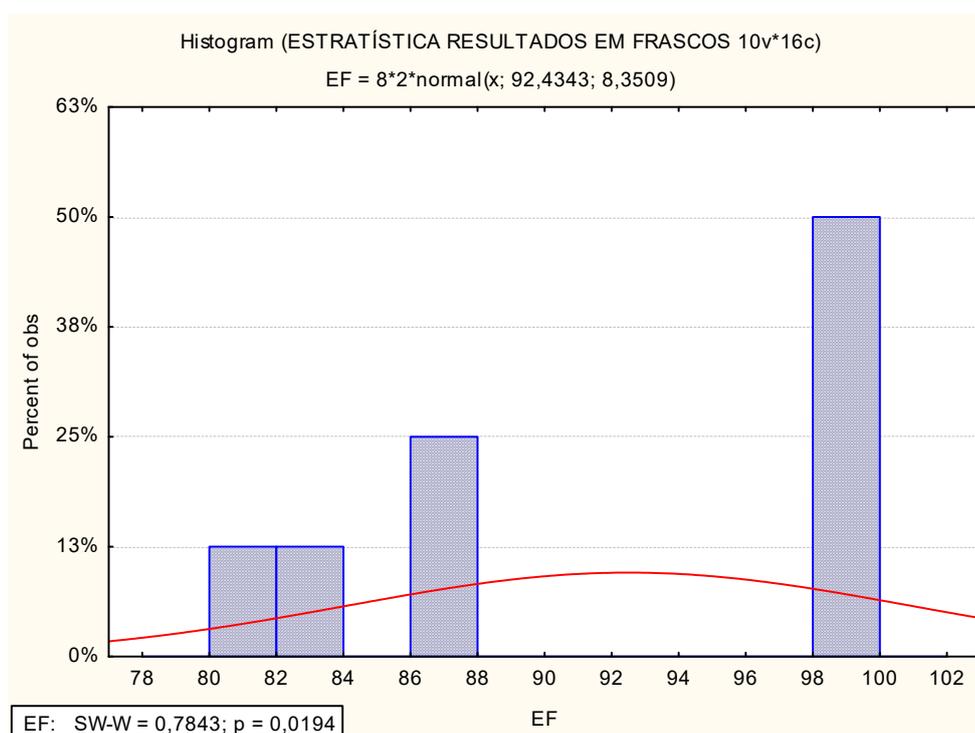
Fonte: O autor, 2022.

### Parâmetro: Eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

A análise de Shapiro Wilk demonstrou que os dados não seguem uma distribuição normal ( $p < 0,05$ ). Nesse caso, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, ilustrado na figura a seguir:

Gráfico 61 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 62 – Teste de homogeneidade das variâncias dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tests of Homogeneity of Variances (ANALISE ESTATISTICA DO CC)					
Effect: "Cod."					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
Prod		0,976517	0,668434	1	0,413598

Fonte: O autor, 2022.

O valor de p foi superior a 0,05 e isso indica que há homogeneidade entre as variâncias, não existindo entre as mesmas discrepâncias significativas, indicando a normalidade e a possibilidade de testes paramétricos (FREY, 2010; SCOTT JONES, 2019). Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey.

### Teste de Tukey

Os dados em negrito e itálico apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 63 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro eficiência de remoção do nitrogênio amoniacal do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Prod (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 C)					
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = ,41963, df = 4,0000					
Cell No.	Cod.	{1}	{2}	{3}	{4}
		100,00	100,00	82,196	87,541
1	GLI/MENOR CONC. NUTR.		1,000000	<b><i>0,000296</i></b>	<b><i>0,000383</i></b>
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR.	1,000000		<b><i>0,000296</i></b>	<b><i>0,000383</i></b>
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR.	<b><i>0,000296</i></b>	<b><i>0,000296</i></b>		<b><i>0,004242</i></b>
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR.	<b><i>0,000383</i></b>	<b><i>0,000383</i></b>	<b><i>0,004242</i></b>	

Fonte: O autor, 2022.

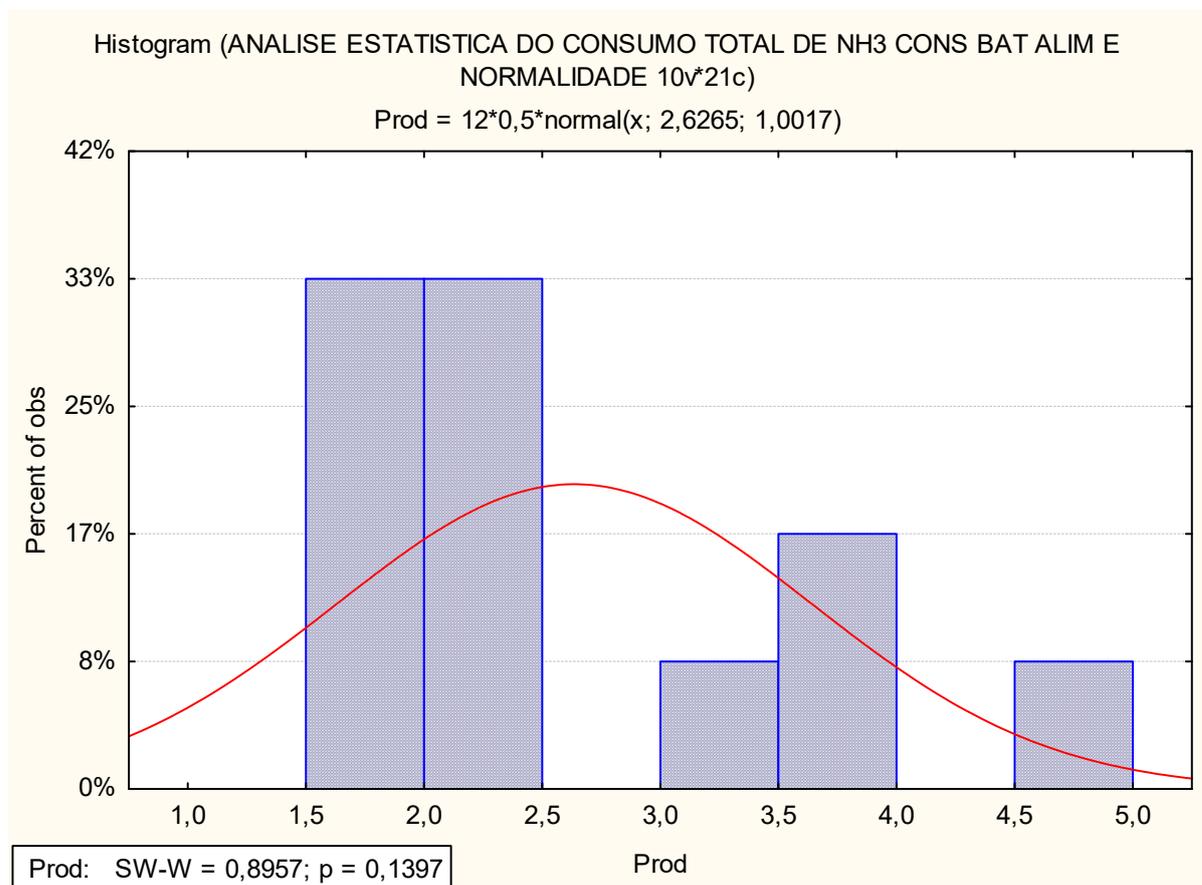
### Parâmetro: Concentração final da biomassa de *A. platensis*

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam

uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 64 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final da biomassa de *A. platensis* do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os dados em **negrito** e *itálico* apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 65 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração final da biomassa de *A. platensis* do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Prod (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 CONS BAT /							
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests							
Error: Between MS = ,05829, df = 6,0000							
Cell No.	Cod.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
		3,4300	4,2700	1,5550	2,3350	1,7873	2,3819
1	GLI/MENOR CONC. NUTR		0,085993	<b>0,002000</b>	<b>0,028293</b>	<b>0,003923</b>	<b>0,034407</b>
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR	0,085993		<b>0,000411</b>	<b>0,001708</b>	<b>0,000555</b>	<b>0,001932</b>
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR.	<b>0,002000</b>	<b>0,000411</b>		0,113270	0,914791	0,091297
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR.	<b>0,028293</b>	<b>0,001708</b>	0,113270		0,329221	0,999939
5	CONTROLE EM NITRATO COM GLI	<b>0,003923</b>	<b>0,000555</b>	0,914791	0,329221		0,266899
6	CONTROLE EM NITRATO SEM GLI	<b>0,034407</b>	<b>0,001932</b>	0,091297	0,999939	0,266899	

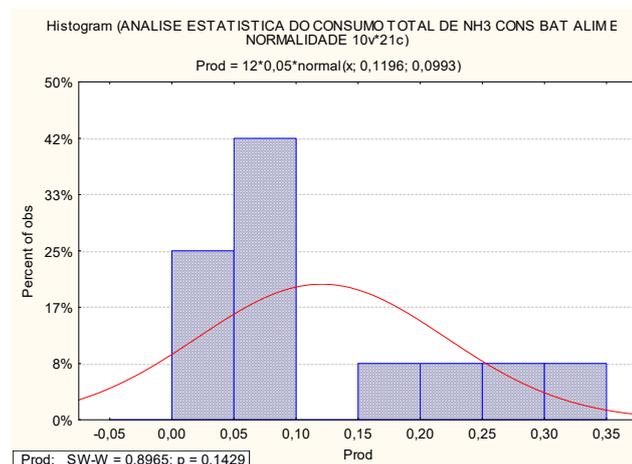
Fonte: O autor, 2022.

### Parâmetro: Produtividade em biomassa de *A. platensis*

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 66 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro produtividade em biomassa de *A. platensis* do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

### Teste de Tukey

Os dados em negrito e *italico* apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 67 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro produtividade em biomassa de *A. platensis* do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Prod (ANALISE ESTATISTICA DO CONSUMO TOTAL DE NH3 CONS BAT . Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00069, df = 6,0000							
Cell No.	Cod.	{1} ,19821	{2} ,28300	{3} ,01107	{4} ,08943	{5} ,04215	{6} ,09404
1	GLI/MENOR CONC. NUTR.		0,113029	<b><i>0,003079</i></b>	<b><i>0,042012</i></b>	<b><i>0,007724</i></b>	0,050516
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR.	0,113029		<b><i>0,000539</i></b>	<b><i>0,002586</i></b>	<b><i>0,000898</i></b>	<b><i>0,002925</i></b>
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR.	<b><i>0,003079</i></b>	<b><i>0,000539</i></b>		0,148717	0,830172	0,122148
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR.	<b><i>0,042012</i></b>	<b><i>0,002586</i></b>	0,148717		0,525005	0,999962
5	CONTROLE EM NITRATO COM GLI	<b><i>0,007724</i></b>	<b><i>0,000898</i></b>	0,830172	0,525005		0,443933
6	CONTROLE EM NITRATO SEM GLI	0,050516	<b><i>0,002925</i></b>	0,122148	0,999962	0,443933	

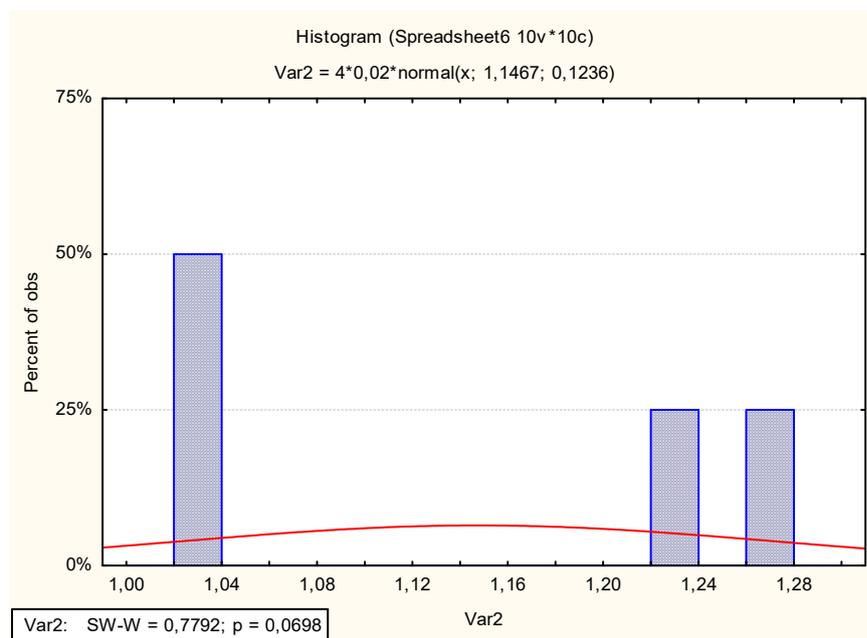
Fonte: O autor, 2022.

## Parâmetro: Concentração final de bactérias heterotróficas

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de t de Student, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 68 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração final de bactérias heterotróficas do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de p, menor que 0,05, indica que houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração final de bactérias heterotróficas produzidas nos meios amoniacais com Glicerol bruto residual alimentados com soluções de alimentação com menor e maior concentração de nutrientes.

Gráfico 69 – Teste t de Student dos dados do parâmetro concentração final de bactérias heterotróficas do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

T-tests: Grouping: Var1 (Spreadsheet6)											
Group 1: GLI/MENOR CONC. NUTR											
Group 2: GLI/MAIOR CONC. NUTR											
Variable	Mean GLI/MENOR CONC. NUTR	Mean GLI/MAIOR CONC. NUTR	t-value	df	p	Valid N GLI/MENOR CONC. NUTR	Valid N GLI/MAIOR CONC. NUTR	Std.Dev. GLI/MENOR CONC. NUTR	Std.Dev. GLI/MAIOR CONC. NUTR	F-ratio Variances	p Variances
Var2	1,253333	1,040000	16,00000	2	0,003884	2	2	0,018856	0,000000	1,602561E+26	0,000000

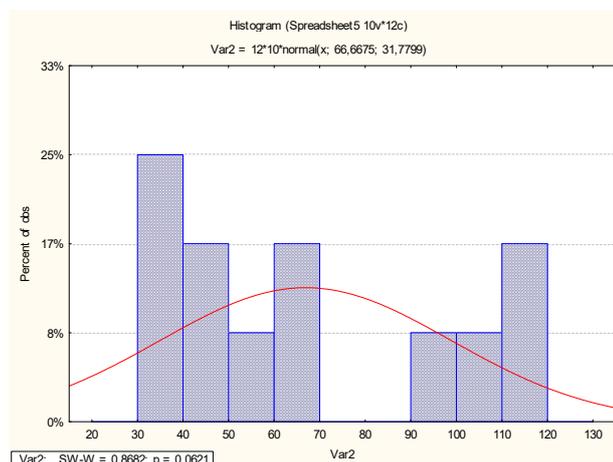
Fonte: O autor, 2022.

### Parâmetro: Acúmulo de ficocianina na biomassa (mg.g<sup>-1</sup>)

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 70– Teste de normalidade dos dados do parâmetro Acúmulo de ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

## Teste de Tukey

Os dados em negrito e *itálico* apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 71 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro Acúmulo de ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

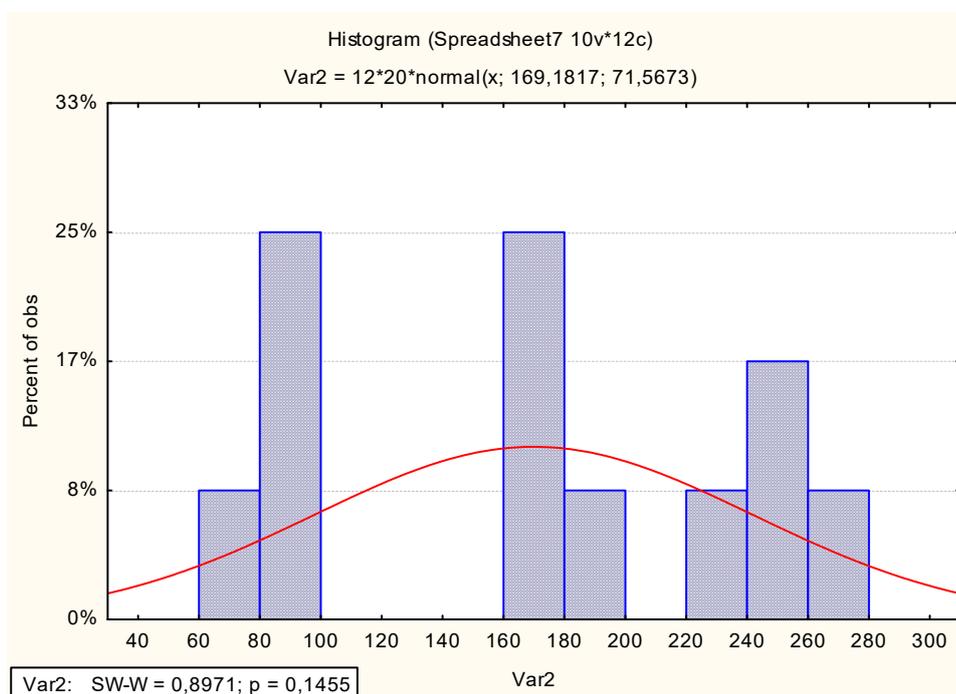
Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet5)							
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests							
Error: Between MS = 7,6811, df = 6,0000							
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	GLI/MENOR CONC. NUTR	51,605	39,829	60,902	116,06	33,324	<b>98,283</b>
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR	<b>0,037814</b>	0,098673	<b>0,000249</b>	<b>0,004590</b>	<b>0,000252</b>	
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR	0,098673	<b>0,002224</b>	<b>0,000249</b>	0,302626	<b>0,000249</b>	
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,005287</b>
5	CONTROLE EM NITRATO COM GLI	<b>0,004590</b>	0,302626	<b>0,000634</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000249</b>
6	CONTROLE EM NITRATO SEM GLI	<b>0,000252</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,000284</b>	<b>0,005287</b>	<b>0,000249</b>	

Fonte: O autor, 2022.

**Parâmetro: Concentração de ficocianina na cultura (mg.L<sup>-1</sup>)****Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 72 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro concentração de ficocianina na cultura (mg.L<sup>-1</sup>) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

## Teste de Tukey

Os dados em negrito e itálico apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 73 – Teste de Tukey dos dados do parâmetro concentração de ficocianina na cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet7)							
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests							
Error: Between MS = 49,129, df = 6,0000							
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
		177,00	170,07	89,160	265,44	79,310	234,11
1	GLI/MENOR CONC. NUTR.		0,905966	<b>0,000315</b>	<b>0,000312</b>	<b>0,000274</b>	<b>0,001575</b>
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR.	0,905966		<b>0,000384</b>	<b>0,000281</b>	<b>0,000299</b>	<b>0,000918</b>
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR.	<b>0,000315</b>	<b>0,000384</b>		<b>0,000249</b>	0,725491	<b>0,000249</b>
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR.	<b>0,000312</b>	<b>0,000281</b>	<b>0,000249</b>		<b>0,000249</b>	<b>0,030229</b>
5	CONTROLE EM NITRATO COM GLI	<b>0,000274</b>	<b>0,000299</b>	0,725491	<b>0,000249</b>		<b>0,000249</b>
6	CONTROLE EM NITRATO SEM GLI	<b>0,001575</b>	<b>0,000918</b>	<b>0,000249</b>	<b>0,030229</b>	<b>0,000249</b>	

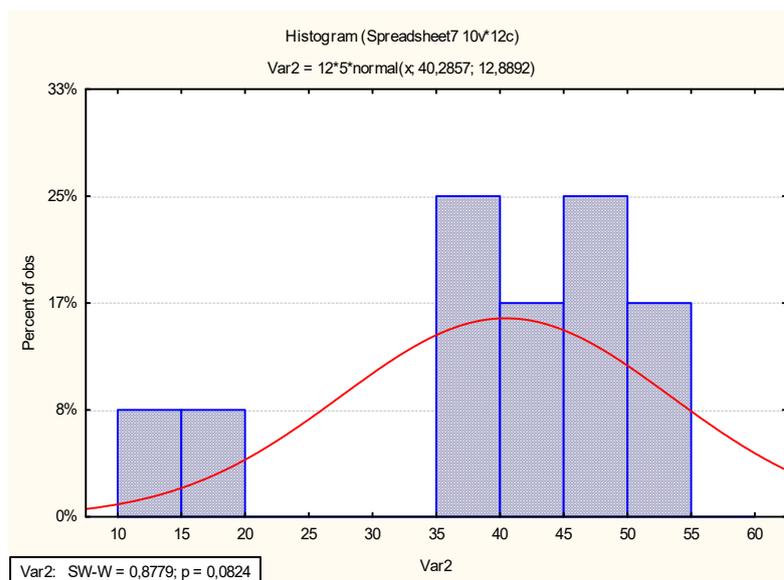
Fonte: O autor, 2022.

## Parâmetro: Proteínas totais na biomassa (%)

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste de Tukey, podem ser realizados nos dados.

Gráfico 74 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro proteínas totais na biomassa (%) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial



Fonte: O autor, 2022.

## Teste de Tukey

Os dados em **negrito** e *itálico* apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Tukey.

Gráfico 75- Teste de Tukey dos dados do parâmetro proteínas totais na biomassa (%) do experimento de avaliação da influência da inserção de glicerol bruto residual e da suplementação de nutrientes no crescimento de *Arthrospira platensis*, assimilação de nitrogênio amoniacal e produção de compostos de interesse industrial

Tukey HSD test; variable Var2 (Spreadsheet7)							
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests							
Error: Between MS = 2,4518, df = 6,0000							
Cell No.	Var1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
1	GLI/MENOR CONC. NUTR	40,520	36,211	54,436	49,340	16,112	45,095
2	GLI/MAIOR CONC. NUTR	0,193629	0,193629	<b><i>0,001039</i></b>	<b><i>0,010140</i></b>	<b><i>0,000257</i></b>	0,160142
3	SEM GLI/MENOR CONC. NUTR	<b><i>0,001039</i></b>	<b><i>0,000376</i></b>		0,110243	<b><i>0,000249</i></b>	<b><i>0,007619</i></b>
4	SEM GLI/MAIOR CONC. NUTR	<b><i>0,010140</i></b>	<b><i>0,001371</i></b>	0,110243		<b><i>0,000249</i></b>	0,202676
5	CONTROLE EM NITRATO COM GLI	<b><i>0,000257</i></b>	<b><i>0,000303</i></b>	<b><i>0,000249</i></b>	<b><i>0,000249</i></b>		<b><i>0,000250</i></b>
6	CONTROLE EM NITRATO SEM GLI	0,160142	<b><i>0,009777</i></b>	<b><i>0,007619</i></b>	0,202676	<b><i>0,000250</i></b>	

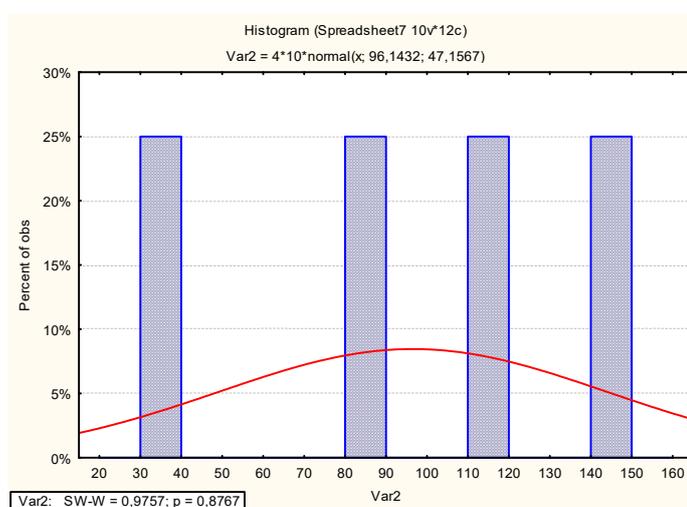
Fonte: O autor, 2022.

## Parâmetro: acúmulo de PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste t de Student podem ser realizados nos dados.

Gráfico 76 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro acúmulo de PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) por *A. platensis*



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de p, maior que 0,05, indica que não houve diferença estatisticamente significativa entre o acúmulo de PHA na biomassa produzida nos meios amoniacais com Glicerol bruto residual alimentados com soluções de alimentação com menor e maior concentração de nutrientes.

Gráfico 77 – Teste t de Student dos dados do parâmetro acúmulo de PHA na biomassa (mg.g<sup>-1</sup>) por *A. platensis*

T-tests; Grouping: Var1 (Spreadsheet7)											
Group 1: GLI/MENOR CONC. NUTR											
Group 2: GLI/MAIOR CONC. NUTR											
Variable	Mean GLI/MENOR CONC. NUTR	Mean GLI/MAIOR CONC. NUTR	t-value	df	p	Valid N GLI/MENOR CONC. NUTR	Valid N GLI/MAIOR CONC. NUTR	Std.Dev. GLI/MENOR CONC. NUTR	Std.Dev. GLI/MAIOR CONC. NUTR	F-ratio Variances	p Variances
Var2	131,8000	60,48632	2,532716	2	0,126891	2	2	18,52620	35,24788	3,619873	0,616140

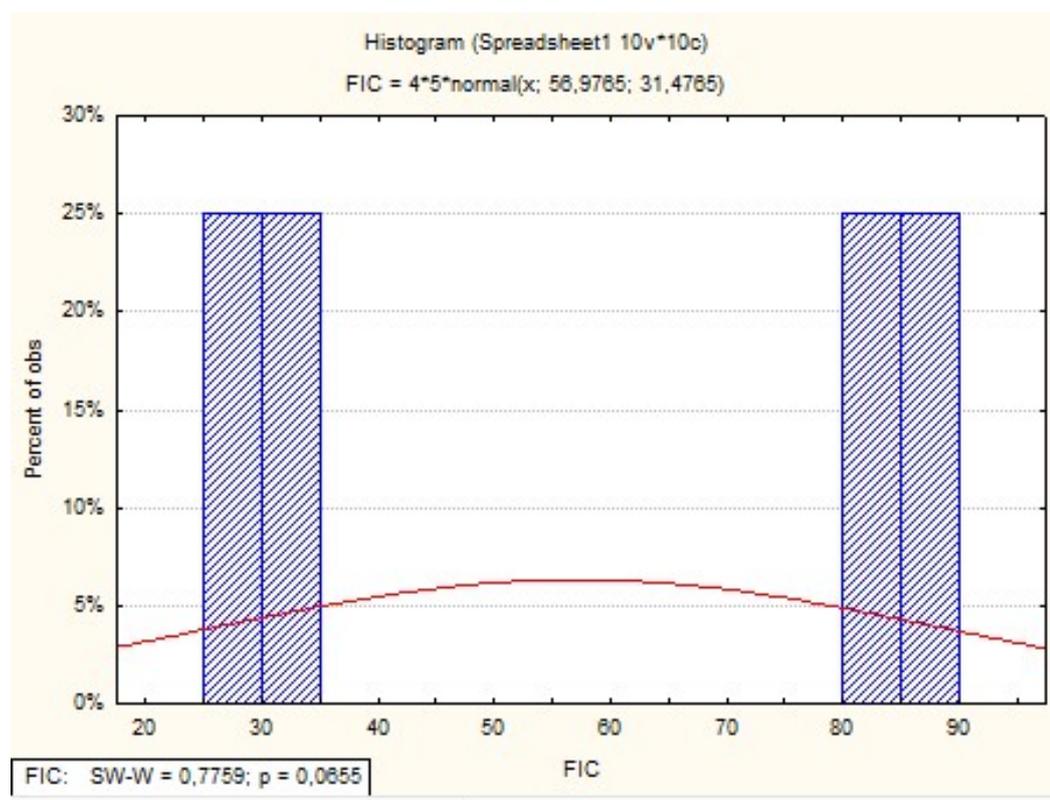
**Avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual: experimentos em garrafas de 5 L (Tabela 4.6)**

**Parâmetro: Ficocianina na biomassa (mg.g<sup>-1</sup>)**

**Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)**

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste t de Student podem ser realizados nos dados.

Gráfico 78 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro Ficocianina na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de  $p$ , menor que 0,05, indica que houve diferença estatisticamente significativa entre o acúmulo de ficocianina na biomassa composta por *A. platensis* e composta por *A. platensis* e bactérias heterotróficas.

Gráfico 79 – Teste t de Student dos dados do parâmetro Ficocianina na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual

T-tests; Grouping: Var1 (Spreadsheet1)											
Group 1: A+B											
Group 2: A											
Variable	Mean A+B	Mean A	t-value	df	p	Valid N A+B	Valid N A	Std.Dev. A+B	Std.Dev. A	F-ratio Variances	p Variances
FIC	29,76311	84,18989	-24,2881	2	0,001691	2	2	1,400707	2,842728	4,118851	0,582911

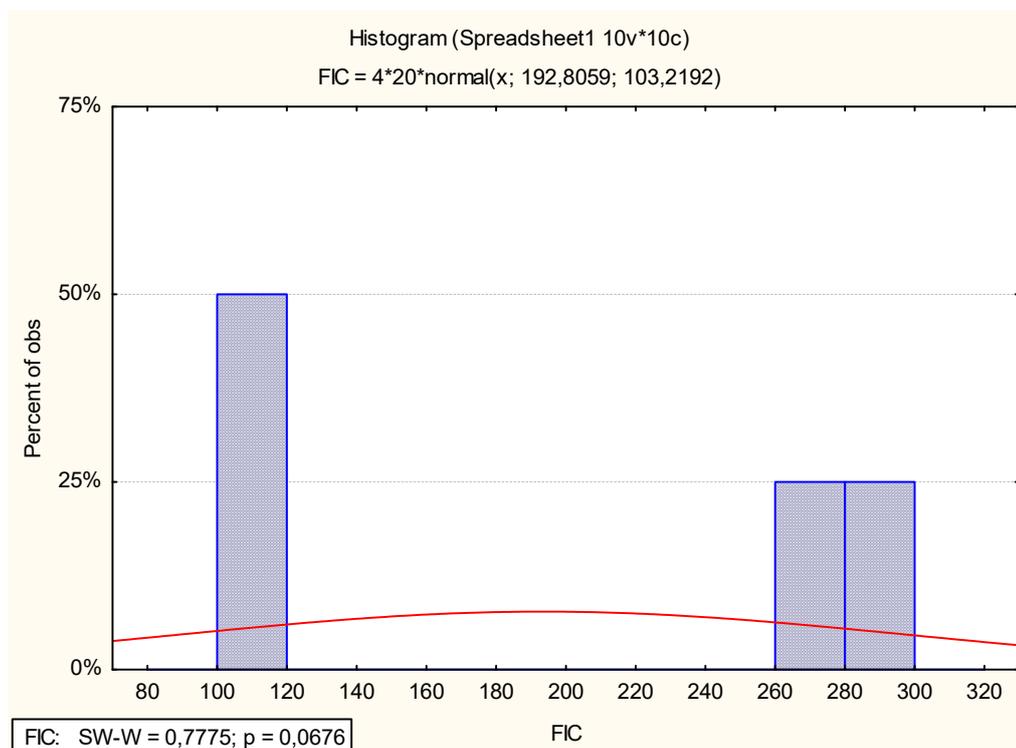
Fonte: O autor, 2022.

### Parâmetro: Ficocianina na cultura ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste t de Student podem ser realizados nos dados.

Gráfico 80- Teste de normalidade dos dados do parâmetro Ficocianina na cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de  $p$ , menor que 0,05, indica que houve diferença estatisticamente significativa entre o acúmulo de ficocianina na cultura composta por *A. platensis* e composta por *A. platensis* e bactérias heterotróficas.

Gráfico 81 - Teste t de Student dos dados do parâmetro Ficocianina na cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual

T-tests; Grouping: Var1 (Spreadsheet1)  
 Group 1: A+B  
 Group 2: A

Mean A+B	Mean A	t-value	df	p	Valid N A+B	Valid N A	Std.Dev. A+B	Std.Dev. A	F-ratio Variances	p Variances
103,5756	282,0361	-23,5911	2	0,001792	2	2	4,874460	9,523139	3,816868	0,602352

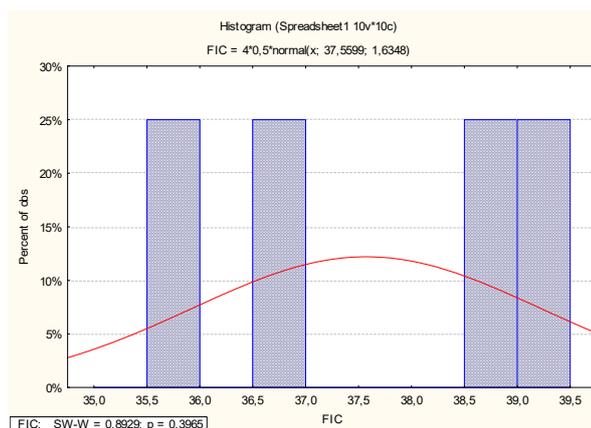
Fonte: O autor, 2022.

### Parâmetro: Proteínas totais (%)

#### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste t de Student podem ser realizados nos dados.

Gráfico 82 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro proteínas totais (%) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de  $p$ , maior que 0,05, indica que não houve diferença estatisticamente significativa entre o acúmulo de proteínas totais na cultura composta por *A. platensis* e composta por *A. platensis* e bactérias heterotróficas.

Gráfico 83 – Teste t de Student dos dados do parâmetro proteínas totais (%) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual

T-tests; Grouping: Var1 (Spreadsheet1)											
Group 1: A+B											
Group 2: A											
Variable	Mean A+B	Mean A	t-value	df	p	Valid N A+B	Valid N A	Std.Dev. A+B	Std.Dev. A	F-ratio Variances	p Variances
FIC	37,58741	38,90847	-0,914469	2	0,457004	2	2	2,036095	0,167834	147,1764	0,104715

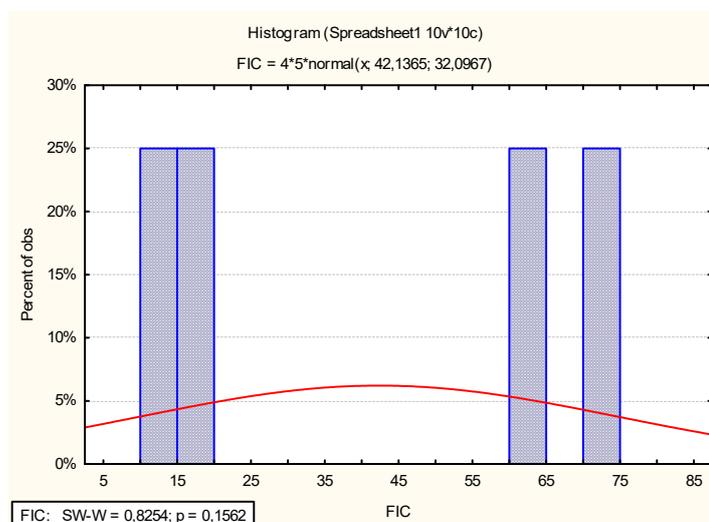
Fonte: O autor, 2022.

## Parâmetro: PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )

### Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

De acordo com as informações cedidas no software Statistica, quando os coeficientes SW-W e os valores de p são superiores a 0,05 (não sendo significativos), os dados apresentam uma distribuição normal. Isso sugere que testes paramétricos, como o teste t de Student podem ser realizados nos dados.

Gráfico 84 – Teste de normalidade dos dados do parâmetro PHA na biomassa ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual



Fonte: O autor, 2022.

### Teste t de Student

O valor de p, menor que 0,05, indica que houve diferença estatisticamente significativa entre o acúmulo de PHA na biomassa composta por *A. platensis* e composta por *A. platensis* e bactérias heterotróficas.

Gráfico 85 - Teste t de Student dos dados do parâmetro PHA na biomassa ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) do experimento de avaliação da influência do aumento de escala do bioprocesso desenvolvido, em batelada alimentada, para o consumo de nitrogênio amoniacal por uma cultura mista de *A. platensis* e bactérias heterotróficas, com glicerol bruto residual

T-tests; Grouping: Var1 (Spreadsheet1)											
Group 1: A+B											
Group 2: A											
Variable	Mean A+B	Mean A	t-value	df	p	Valid N A+B	Valid N A	Std.Dev. A+B	Std.Dev. A	F-ratio Variances	p Variances
FIC	69,70000	14,57305	10,85240	2	0,008384	2	2	6,646804	2,725210	5,948751	0,495417

Fonte: O autor, 2022.