



AVALIAÇÃO DO CULTIVO MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL SUPLEMENTADO COM EFLUENTE DE FILTRO ANAERÓBIO

Thiago Santos de Almeida Lopes¹; Weruska Brasileiro Ferreira²; Olga Elizabeth Lucena Almeida³; Yohanna Jamilla Vilar de Brito⁴; Thyago Nóbrega Silveira⁵.

¹ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – thiago.s.16@hotmail.com

² Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - weruska_brasileiro@yahoo.com.br

³ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - olgaelyzabeth@hotmail.com

⁴ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - yohannajvb@gmail.com

⁵ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - thyagonobrega@hotmail.com

RESUMO

Com a iminente crise energética no Brasil, fontes alternativas de energia devem e têm sido cada vez mais estudadas. Os biocombustíveis se destacam na medida em que contribuem para mitigar a emissão de CO₂, característica dos combustíveis fósseis, e são geralmente obtidos a partir de óleos de produtos agrícolas como a cana-de-açúcar, mamona e soja, que requerem grandes áreas agricultáveis e podem impactar a produção de alimentos, causar o empobrecimento do solo e erosão. Nesse sentido as microalgas surgem como uma versátil alternativa para a produção de biocombustíveis, uma vez que assimilam uma maior taxa de CO₂, possuem um teor de óleo maior que as oleaginosas e não necessitam de grandes extensões de espaço para seu cultivo. O presente trabalho teve por objetivo maximizar o potencial de desenvolvimento da microalga *Chlorella sp* visando a produção de biocombustíveis utilizando efluentes de filtro anaeróbico, com vistas a reduzir o custo dos cultivos, bem como promover um destino adequado para esses resíduos líquidos. A microalga foi cultivada em sistema mixotrófico utilizando meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM), suplementado com extrato de levedura e com efluente de filtro anaeróbico nas proporções de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, 100%. Observou-se que com o efluente de filtro anaeróbico foi possível realizar o cultivo sem a necessidade do meio sintético. Dessa forma, pôde-se concluir que há viabilidade no cultivo de microalgas por meio da suplementação de resíduos líquidos, gerando assim uma nova possibilidade de produção de biocombustíveis.

Palavras-chave: biocombustíveis, microalgas, *Chlorella sp*, filtro anaeróbico.

1. INTRODUÇÃO

Em 2008, os combustíveis fósseis foram responsáveis por 88% do consumo de energia primária mundial. Estima-se que até 2025 a demanda desses combustíveis aumentará em 57% a fim de suprir a exigência da população em

crescimento [BRENNAN; OWENDE, 2010]. Porém, é preciso considerar a falência dos recursos naturais e os efeitos nocivos da queima destes combustíveis. Deste modo, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas e políticas que promovam as fontes renováveis de energia para mitigar a exaustão destes



recursos, viabilizando assim a sustentabilidade ambiental e econômica.

Apesar da potencialidade de utilização dos biocombustíveis, muitos desafios têm impedido a viabilidade comercial que poderia permitir sua produção e utilização sustentável. O processo ainda é limitado por alguns fatores relacionados aos custos de produção, envolvidos na composição do meio, e falta de dados para espécies vegetais de grande porte e sobre como alcançar maior eficiência fotossintética.

1.1. Produção de biocombustíveis a partir de microalgas

Para a obtenção dos biocombustíveis, as microalgas podem ser convertidas por métodos termoquímicos e bioquímicos, o que não é uma ideia nova, mas que agora se difunde devido ao aumento do custo do petróleo, bem como a preocupação sobre o aquecimento global decorrente da queima de combustíveis fósseis [SAWAYAMA et al., 1995].

Para produção de etanol são utilizadas espécies que produzem altos níveis de carboidratos. Estima-se, segundo Nguyen e Vu [2012], que a produção a partir das microalgas seja em torno de 46.760 – 140.290 L/ha, eficiência maior que a de outras matérias-primas, como está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Rendimento de Etanol a partir de diferentes fontes.

Fonte	Rendimento de Etanol (L/ha)
Palha de Milho	1.050-1.400
Trigo	2.590
Mandioca	3.310
Sorgo doce	3.050-4.070
Milho	3.460-4.020
Beterraba açucareira	5.010-6.680
Microalgas	46.760-140.290

A produção de bioetanol a partir de algas marinhas tem um grande potencial para o desenvolvimento sustentável. No

entanto a produção de energia a partir de microalgas só será viável economicamente se os custos de produção forem baixos.

Microalgas podem oferecer vários tipos de biocombustíveis renováveis. Estes incluem o metano ou biogás, produzidos pela digestão anaeróbica da biomassa, o biodiesel derivado de óleo de microalgas, dihidrogênio produzido pela lignina celulósica por meio da fermentação, e o bioetanol e biobutanol obtido do açúcar da biomassa por meio da fermentação [SPOLAORE et al., 2006].

As microalgas apresentam rendimentos, tanto em termos de biomassa quanto em produção de óleo, muito superiores aos das principais culturas para a produção de biodiesel. No entanto necessita-se de grande investimento para a implementação dessa tecnologia.

1.2. Crescimento das microalgas

Em condições favoráveis as microalgas podem crescer rapidamente, duplicando seu número de células por um período de 24h ou menos, durante a fase de crescimento exponencial. Um dos métodos para avaliar o crescimento é o aumento da densidade celular, que pode ser percebida através da curva de crescimento apresentada na Figura 1.

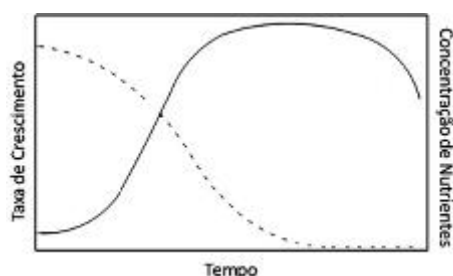


Figura 1: Curva de crescimento de uma cultura microalgal em relação à disponibilidade de nutrientes. Fonte: MATA et al., 2010.

1.3. Tipos de cultivo

Conforme a fonte de carbono empregada, os cultivos de microalgas



podem ser classificados em três tipos: heterotrófico, onde o fornecimento de carbono é realizado pela introdução de compostos orgânicos apropriados ao meio de cultura (glicose, glicerol, entre outros); mixotrófico, onde o carbono é disponibilizado tanto por meio de compostos orgânicos quanto pelo CO₂ atmosférico (CO₂ inorgânico); autotrófico, onde a única fonte de carbono disponibilizada é o CO₂ inorgânico. Neste caso, o carbono inorgânico pode estar na forma de CO₂, ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃) ou carbonato (CO₃).

A maioria das espécies das microalgas são fotoautotróficas, ou seja, podem obter energia da luz do sol utilizando a atmosfera como fonte de carbono.

O cultivo mixotrófico garante maior rendimento de biomassa, no qual atuam o metabolismo heterotrófico e autotrófico. A microalga ao mesmo tempo assimila o CO₂ autotroficamente e o carbono orgânico disponível. Algumas espécies de microalgas estabelecem rendimento muito maior quando cultivadas em regime mixotrófico. A fonte de carbono é um dos principais componentes na produção de biomassa microalgal [RADMANN et al., 2009].

O dióxido de carbono (CO₂) é a fonte de carbono preferencial das microalgas, difundindo passivamente do meio de cultivo ao meio intracelular e sendo utilizado diretamente nos processos de fixação de carbono [DERNER, 2006]. Portanto, com a adição de CO₂ no meio de cultivo pode-se aumentar em até sete vezes a multiplicação celular, enquanto que a redução da disponibilidade de carbono pode ser fator limitante para o crescimento microalgal [MORAIS, 2011].

1.4. Tratamento de esgoto doméstico

A importância de introduzir o cultivo de microalgas no tratamento de águas residuárias é que elas necessitam de compostos orgânicos em sua nutrição,

favorecendo a redução dos compostos de nitrogênio e fósforo. Com isso, as microalgas reduzem as concentrações desses nutrientes nas águas residuárias, prevenindo a eutrofização de corpos aquáticos [MATA et al., 2010].

As microalgas e cianobactérias são usadas no tratamento de águas residuárias devido aos baixos custos envolvidos frente aos sistemas convencionais de tratamento de efluentes. Além disso, soma-se a esta vantagem a formação de outros compostos com alto valor agregado, como os biocombustíveis [BONINI, 2000].

Os filtros anaeróbios são utilizados para tratamento de esgotos desde 1950, sendo os primeiros trabalhos datados da década de 60. Desde então tem tido uma aplicação crescente, promovendo hoje uma tecnologia avançada para o tratamento dos esgotos domésticos e efluentes industriais [CHERNICHARO, 2007].

O filtro consiste de um tanque que funciona como reator e estabiliza a matéria orgânica por meio de microrganismos que formam o biofilme aderidos ao leito filtrante, constituído basicamente de pedra ou outro material inerte operando em fluxo vertical, tanto ascendente como descendente [MACHADO, 1997].

O efluente do filtro anaeróbio é geralmente bastante clarificado e apresenta baixa concentração de matéria orgânica, inclusive dissolvida. Porém, é rico em nitrogênio e fósforo, sendo indicado para uso (reuso) em hidroponia ou para irrigação com fins produtivos [CHERNICHARO, 2007].

Neste sentido, uma boa alternativa é aliar a produção de microalgas com meios de cultura alternativos, entre os quais é possível destacar: águas residuárias, efluentes de biodigestores, lodo digerido, vinhaça de cana-de-açúcar, dentre outros.

Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo maximizar a produção da microalga *Chlorella sp*



visando a produção de biocombustível, utilizando efluentes de filtro anaeróbio com vistas a reduzir o custo dos cultivos, bem como promover um destino adequado para esses efluentes.

2. METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizadas cepas da espécie de microalga *Chlorella sp* existentes no Laboratório de Saneamento da UEPB, que foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina. A Figura 2 apresenta a fotomicrografia das cepas de *Chlorella sp* utilizadas em todo o estudo.

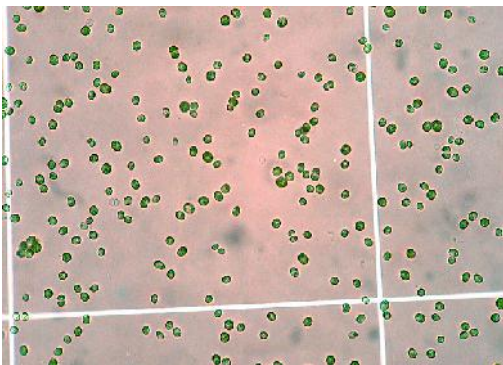


Figura 2: Fotomicrografia da microalga *Chlorella sp* em ampliação de 400x.

O meio sintético utilizado para o cultivo da *Chlorella sp* foi o *Bold's Basal Medium* (BBM) suplementado com extrato de levedura. A partir das culturas mantidas em meio sólido, em tubos de ensaios, foram desenvolvidas novas culturas em meio líquido através de repiques de cultivo durante a fase exponencial do crescimento da microalga.

A fonte nutricional adicionada ao meio BBM foi o efluente de Filtro Anaeróbio coletado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários, apresentando DQO de 438 mg O₂/L, detenção hidráulica de 6 (seis) dias com adição de sulfato de sódio (Na₂SO₄), pH elevado e volatilização da amônia (NH₄) assim como a remoção do

fósforo. Suplementado nas seguintes proporções 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100%, bem como sem a adição de BBM, todos os cultivos foram iniciados com inoculo na proporção de 1:10.

Antes da adição do efluente ao BBM foi realizado pré-tratamento físico, que consistiu em deixá-lo decantar em erlenmeyers, com capacidade volumétrica de 1L, por 24 horas para retirada de materiais em suspensão e uma posterior filtração para reter possíveis sólidos suspensos que ainda existissem.

As aclimações químicas foram realizadas com a inoculação do cultivo ao BBM e mantendo o pH do meio em 6,6. As condições físicas mantidas nos experimentos foram: temperatura em 26°C ± 2, agitação por injeção contínua de ar e iluminação de 4klux provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40W com fotoperíodo de 12 horas com o tempo de iluminação mantido por um controlador de tempo automático, realização de contagens diárias, com o auxílio da câmera de Neubauer em microscopia óptica com o aumento de 400x. Deste modo, foram elaborados gráficos de dispersão que se assemelham as curvas de crescimento da espécie em estudo, nos quais plotou-se no eixo da ordenada o número de células.mL⁻¹ e no eixo da abscissa o tempo de cultivo em dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi efetuado com a suplementação do efluente de Filtro Anaeróbio no cultivo de *Chlorella sp* em meio BBM adicionando as concentrações já citadas como fonte nutricional. Para melhor compreensão e análise dos resultados de cada concentração realizou-se um comparativo entre as mesmas.

A Figura 3 ilustra os dados experimentais do cultivo que obteve menor desenvolvimento da microalga, que foi o suplementado com BBM composto de 5% de efluente do Filtro anaeróbio. Na adaptação do cultivo o mesmo se



manteve estacionado durante os quatro primeiros dias e ao final apresentou uma média de densidade celular máxima de $1,15 \times 10^7$ cel.mL⁻¹, partindo de uma população celular de $4,99 \times 10^5$ cel.mL⁻¹.

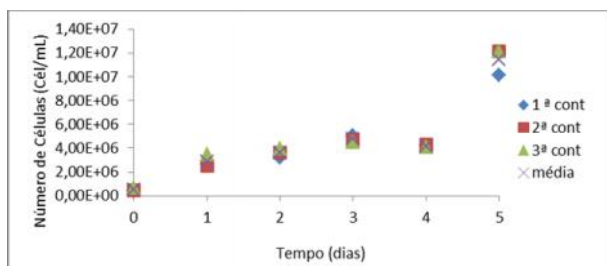


Figura 3: Dados experimentais da *Chlorella sp* cultivada em BBM com adição de 5% de efluente de Filtro Anaeróbio.

A figura 4 ilustra os dados experimentais do cultivo que obteve melhor desenvolvimento da *Chlorella sp*, que foi aquele realizado com BBM suplementado com 10% de efluente do Filtro Anaeróbio. O cultivo teve seu início com uma densidade populacional de $1,10 \times 10^6$ cel.mL⁻¹ e apresentou no quinto dia uma população de $3,13 \times 10^7$ cel.mL⁻¹. Verificou-se no cultivo um crescimento crescente e contínuo.

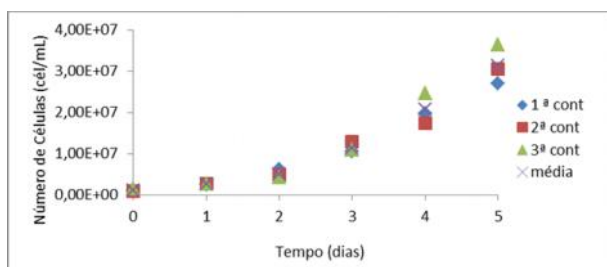


Figura 4: Dados experimentais da *Chlorella sp* cultivada em BBM com adição de 10% de efluente Filtro Anaeróbio.

Mezzomo et al. [2010] utilizou efluente de suíno, rico em fósforo e nitrogênio inorgânicos, para a produção de biomassa de microalga *Spirulina platensis* e observou remoção de DQO e fósforo, além da produção de biomassa. Igual semelhança com a utilização do efluente do filtro anaeróbio destaca a

solução para o impacto ambiental gerado pelo lançamento de efluentes em fontes naturais.

PÉREZ et al. [2004], realizaram estudos e foi percebido que algas isoladas de estações de tratamento de águas residuárias ou de corpos d'água adaptam-se melhor às condições práticas de cultivo e demonstram maior eficiência na remoção de nutrientes inorgânicos. Confirmando os resultados obtidos utilizando-se a suplementação do efluente de Filtro Anaeróbio, figura 5, nos cultivos foi obtido ótimo crescimento celular, destacando-se maior eficiência para produção de biocombustível as concentrações de 10 e 80%. O efluente pode ser utilizado em sua totalidade sem adição do meio sintético, com objetivo de tratamento do mesmo, favorecendo a redução dos nutrientes presentes em tais efluentes, assim como o desenvolvimento das microalgas.



Figura 5: Comparativo entre os cultivos suplementados com efluente de Filtro Anaeróbio.

A adição do efluente do Filtro Anaeróbio forneceu matéria orgânica e suplementação nutritiva ao meio, fazendo com que a microalga pudesse se desenvolver acima do esperado tendo em vista o aumento na densidade populacional das mesmas.

A equação 1 representa o modelo matemático reduzido e codificado proposto para analisar a máxima concentração de biomassa em função dos parâmetros tempo e concentração de vinhaça.

$$Z = 10,27 + 18,63x - 0,58y + 0,55xy \quad [1]$$



O gráfico de superfície de resposta, ilustrado na figura 6, foi gerado a partir da equação 1. Os termos da equação representam a concentração da biomassa no eixo z, o tempo em x, e a concentração de efluente do filtro anaeróbico no eixo y. Na superfície de resposta observa-se que há uma fase de adaptação e ao final do quinto dia o cultivo da *Chlorella sp* em BBM adicionando 100% do efluente apresentou uma maior densidade celular, $3,21 \times 10^7$ cel.mL⁻¹.

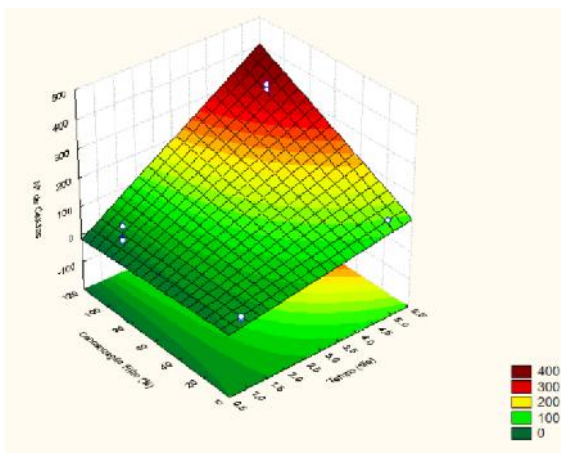


Figura 6: Superfície de resposta para o modelo de concentração de biomassa.

O crescimento da microalga em meio de cultura BBM suplementado com a adição de efluente de filtro anaeróbico, nas proporções de 5% e 100%, foi avaliado estatisticamente através do gráfico de Pareto, representado na figura 7.

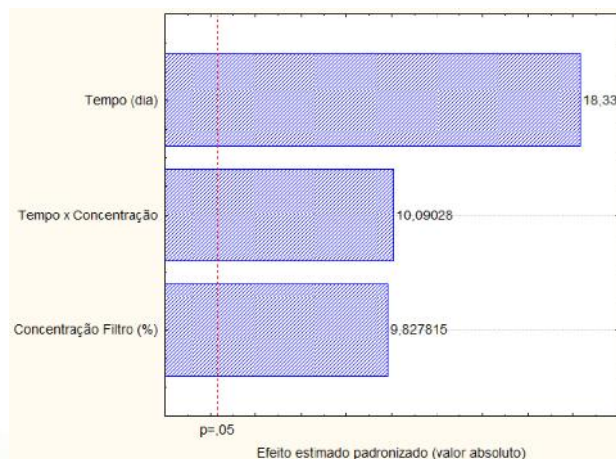


Figura 7: Diagrama de Pareto da máxima concentração de biomassa utilizando o efluente de filtro anaeróbico em BBM.

De acordo com o diagrama de Pareto, ilustrado na figura 7, as variáveis estudadas são estatisticamente significativas, apresentando confiabilidade de 95%. O tempo de cultivo, a suplementação com o efluente e a interação entre os ambos contribuem positivamente com o aumento da densidade celular.

4. CONCLUSÕES

Perante a avaliação do desenvolvimento da microalga, *Chlorella sp*, por meio do uso dos efluentes de tratamento de esgoto doméstico como suplementação nutricional, visando a produção de biocombustíveis, pode-se concluir que:

- O uso do cultivo de microalgas para o tratamento de efluentes acoplado à geração de biocombustíveis é uma opção atrativa em termos de redução dos custos energéticos, emissão de gases de efeito estufa, nutrientes e água doce;
- A produtividade elevada da biomassa de microalgas a partir de águas residuárias sugere que este método de cultivo é viável para geração de biocombustível, avaliado como uma das muitas abordagens utilizadas para produção de energia sustentável e renovável;
- O cultivo suplementado com efluente do filtro anaeróbico apresentou ótimo desenvolvimento celular, alcançando uma densidade máxima de $3,13 \times 10^7$ cel.mL⁻¹ em decorrência da adição de 10% do efluente, sendo eficaz para produção de biocombustível bem como remoção de nutrientes do efluente.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRENNAN, L.; OWENDE, P. **Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, p. 557-577, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias - Reatores Anaeróbios.** UFMG, 2007.

DERNER, R. B. et al. **Microalgas, produtos e aplicações.** Ciência Rural, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

MACHADO, R. M. G.; CHERNICHARO, C. A. L. **Avaliação do desempenho de filtros anaeróbios utilizados para o polimento de efluentes de um reator UASB.** 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, ABES, 1997.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO N. S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 14, p. 217-232, 2010.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. **Cultivation of microalgae Spirulina platensis (Arthrospira platensis) from biological treatment of swine wastewater.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga Phaeodactylum tricornutum em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos.** 2011, 97f. Dissertação de

Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. Curitiba-PR.

NGUYEN, T. H. M.; VU, V. H. **Bioethanol production from marine algae biomass: prospect and troubles,** v. 3, n. 1, p. 25-29, 2012.

PÉREZ, M. V. J.; CASTILLO, P. S.; ROMERA, O.; MORENO, D. F.; MARTÍNEZ, C. P. **Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure.** Enzyme and Microbial Technology, v. 34, p. 392-398, 2004.

PITTMAN, J. K.; DEAN, A. P.; OSUNDEKO, O. **The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.** Bioresource Technology, v. 102, p. 17-25, 2010.

RADMANN, E.; OLIVEIRA, C. F.; ZANFONATO, K.; VIEIRA, J. A. **Cultivo Mixotrófico da Microalga Spirulina sp. LEB-18 com Adição Noturna de Diferentes Fontes de Carbono Orgânico.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA, S. Y. **CO₂ fixation and oil production through microalga.** Energy Convers, v. 36, p. 729-731, 1995.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. **Commercial applications of microalgae.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, p. 87-96, 2006.