

Avaliação do cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da agroindústria de óleo de palma

Rodrigo Carvalho do Nascimento¹, Maiara Sousa Fernandes², Hugo Santana³, Carolina Cereijo⁴, Lorena Costa Garcia⁵, Félix Gonçalves Siqueira⁶, Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil⁷

Resumo

O *palm oil mill effluent* (Pome) é o principal efluente líquido gerado pela indústria do óleo de palma. Para cada tonelada de óleo extraído são necessários de 5 a 7,5 toneladas de água e cerca de 50% deste volume termina como efluente. A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais, além de constituir um processo biológico de baixo custo, permite o aproveitamento da biomassa algal produzida para produção de energia, ração animal e pigmentos, por exemplo. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de biorremediação e produção de biomassa em efluente de lagoa de estabilização de Pome (ELE-Pome) da cepa de microalga *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40. As microalgas foram cultivadas nos meios ELE-Pome e BBM (meio sintético controle) em fotobiorreatores *air lift* de placas planas com capacidade de 15 L. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o ELE-Pome pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa da microalga *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 sem necessidade de suplementação de nutrientes. Com relação à biorremediação do efluente, os ensaios mostraram que há remoção significativa de nitrogênio e fósforo principalmente durante a fase de crescimento exponencial das células, período que coincide a máxima produtividade de biomassa algal.

¹ Engenheiro Bioquímico, mestrando em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, rodrigo.nascimento@colaborador.embrapa.br

² Engenheira Bioquímica, mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, maiara.fernandes@colaborador.embrapa.br

³ Doutorando em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, hugo.santana@colaborador.embrapa.br

⁴ Doutoranda em Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, carolina.cereijo@colaborador.embrapa.br

⁵ Engenheira de alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁶ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Biologia Molecular), pesquisador da Embrapa Agroenergia, felix.siqueira@embrapa.br

⁷ Biólogo, doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia), pesquisador da Embrapa Agroenergia, bruno.brasil@embrapa.br

Introdução

Países como Malásia e Indonésia são responsáveis por 85% da produção mundial de óleo de palma, enquanto outros como Nigéria, Tailândia, Colômbia, Equador e Papua-Nova Guiné complementam outros 6% do mercado. Atualmente, a produção de óleo de palma no Brasil é de aproximadamente 300 mil toneladas por ano, proveniente, em sua maioria, do Estado do Pará. Essa produção não é capaz de suprir o mercado interno, já que o consumo anual gira em torno de 500 mil toneladas. Os principais fornecedores do produto para o Brasil são Colômbia e Equador (ABRAPALMA, 2016).

A composição do Pome é variável, mas de um modo geral possui altas concentrações de demanda química de oxigênio (DQO), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e sólidos orgânicos em suspensão. O sistema tradicional de tratamento é o de lagoas de estabilização que, geralmente, consiste de um tratamento primário, em que ocorre a fase de sedimentação e/ou flotação da matéria sólida; tratamento secundário, no qual os sólidos orgânicos em suspensão são removidos por processos físicos, químicos e biológicos; e, por fim, o resíduo passa por um tratamento terciário, para desinfecção da água e eliminação da carga inorgânica (SASONGKO; NOGUCHI, 2015; CHIU et al., 2015).

Microalgas são microrganismos clorofilados, capazes de converter fotossinteticamente dióxido de carbono atmosférico em uma grande variedade de metabólitos e produtos químicos incluindo proteínas, polissacarídeos e lipídeos. Além disso, durante o metabolismo, as células de microalgas assimilam nitrogênio e fósforo, característica importante para processos de tratamento de águas residuais (SAMBUSITI et al., 2015). O cultivo de algas em efluentes alia biorremediação e produção de biomassa, reduzindo a utilização de água doce e os custos com adição de nutrientes. Desenvolver uma metodologia de cultivo desses microrganismos pode revolucionar a produção de energia limpa e os sistemas de tratamento de águas residuais. Para tanto, é necessário compreender a cinética de crescimento de microalgas em águas residuais, além de aprimorar-se a produtividade desse bioprocessos (LEE; ZHANG, 2016). Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a capacidade das microalgas *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 de biorremediar o ELE-Pome (Pome biodigerido, obtido da lagoa aeróbia de estabilização) e de produzir biomassa, quando cultivadas em fotobiorreatores de placas planas suplementados com CO₂.

Material e métodos

Microalgas

Foi estudada uma cepa de *Chlamydomonas biconvexa* pertencente à coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia, nomeada como Embrapa|LBA40 (Figura 1).



Figura 1. *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 (A e B).

Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia de luz utilizando técnica DIC (contraste diferencial de fase). Escala: 5 μ m.

Fonte: Catálogo da coleção de microalgas aplicadas à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa.

Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultivo: i) Bold's Basal Medium (BBM) modificado por Brunale (2014); ii) Efluente da Lagoa anaeróbia de Estabilização do Pome (ELE-Pome) coletado na agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá, PA). Antes do cultivo, o ELE-Pome foi centrifugado a 16.267 x g por 5 minutos, como pré-tratamento para redução dos sólidos suspensos.

Produção de inóculo algal e cultivo em fotobiorreator

Os inóculos algais foram produzidos em condições estéreis, utilizando-se frascos erlenmeyers de 1 L contendo 500 ml de meio BBM em condições estéreis, com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12/12 claro/escuro,

temperatura de 28 °C e aeração de 10 L.h⁻¹. Após 7 dias de cultivo, equivalente ao fim da fase exponencial, o conteúdo dos erlenmeyers foi homogeneizado em um frasco único e inoculado em quantidade suficiente para garantir a densidade ótica inicial de 0,1 nos fotobiorreatores de placas planas. A quantidade de inóculo utilizada foi sempre 10% menor do volume de trabalho nos fotobiorreatores.

A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 foi cultivada em fotobiorreatores *air lift* de placas planas, com iluminação artificial de 35.000 Lux em ciclos de 12h/12h claro/escuro, temperatura de 25 °C no escuro e 35 °C no claro, aeração de 60 L.h⁻¹ e suplementação de CO₂ ajustada para 5 % da vazão de ar. Os cultivos foram realizados em bateladas independentes durante 5, 10 e 15 dias, utilizando 13 L de ELE-Pome ou de meio BBM. Os três períodos foram escolhidos de modo a ser avaliada a influência do tempo de cultivo na taxa de crescimento celular e remoção dos nutrientes do meio. A biomassa foi obtida por centrifugação do cultivo, sendo então congelada a -80 °C por 24 h e posteriormente liofilizada (Liofilizador LIOTOP K105). O sobrenadante foi autoclavado por 15 minutos e armazenado em bombonas para análises da composição química.

Quantificação do crescimento algal

A quantificação do crescimento algal foi feita a partir de amostras retiradas no tempo inicial e final dos cultivos. Foram realizadas medidas de determinação de peso seco, na qual três amostras de 10 mL foram centrifugadas, lavadas com 10 mL de água destilada (3x) e então ressuspendidas em água destilada. A biomassa lavada foi adicionada às placas, previamente taradas, postas em estufa por 24 h a 105 °C e em seguida pesadas. A diferença entre a massa da placa com biomassa seca e da placa vazia foi definida como o peso seco da amostra.

Análise dos sobrenadantes dos cultivos algais

Os sobrenadantes dos cultivos algais em fotobiorreatores de placas planas utilizando ELE-Pome foram caracterizados quanto à demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), conteúdo de fosfato, nitrato, nitrito, nitrogênio amoniacal, potássio, turbidez, pH e carbono orgânico total. Essas análises foram realizadas pela empresa Ambientale, em Maringá, PR.

Análises estatísticas

Foi realizada análise da variância (Anova) de fator único com repetição, usando o teste de Tukey, a 5% de significância, para comparação entre as médias, utilizando-se o programa Sisvar.

Resultados e discussões

Não foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) no crescimento da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 quando cultivada nos dois substratos de crescimento testados, ou seja, meio BBM ou ELE-Pome (Figura 2). Esses resultados sugerem que os nutrientes presentes no ELE-Pome são suficientes para garantir um crescimento algal vigoroso dessa cepa. É importante ressaltar que as produtividades obtidas neste estudo, são superiores às aquelas relatadas na literatura. Por exemplo, Wu et al. (2012) relataram o cultivo de *Chlamydomonas* sp. em efluente de estação de tratamento de água, no qual obtiveram $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de produtividade de biomassa. Já Ledda et al. (2015) isolaram uma cepa autóctone de *Chlorella* sp. de tanques de armazenamento de esgoto da criação de suínos e testaram formulações do efluente como fonte de cultivo para a cepa. Como resultado, obtiveram produtividades máximas de $220 \text{ mg.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

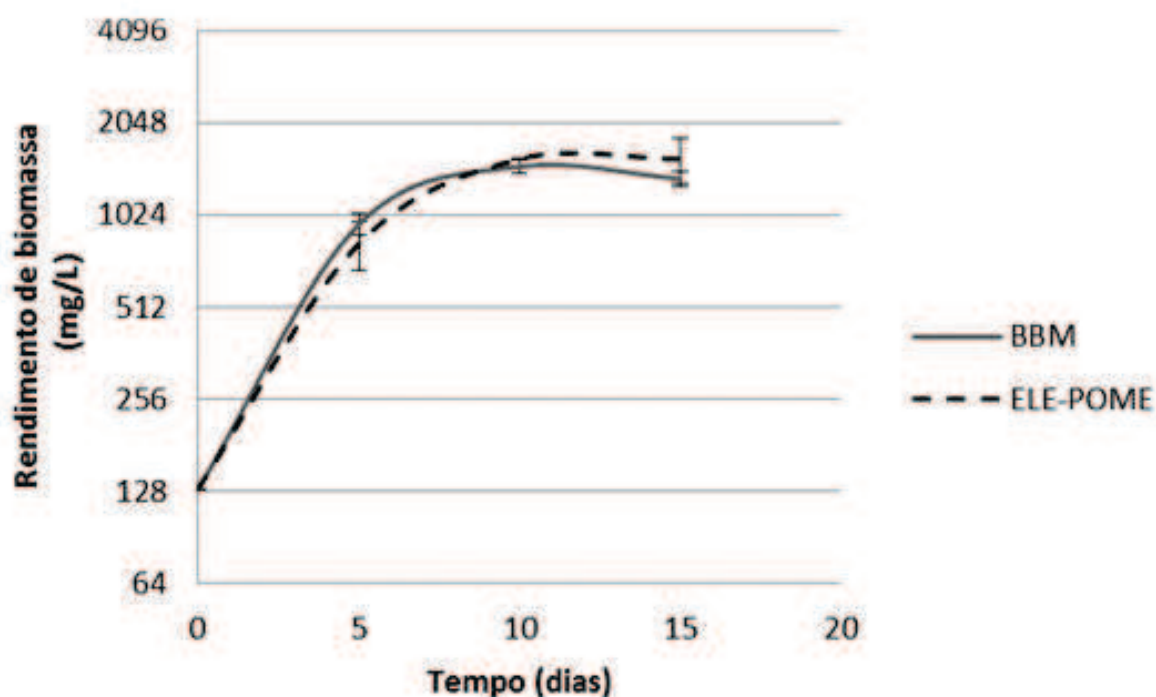


Figura 2. Curva de crescimento da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 cultivada em fotobiorreatores *air-lift* de placas planas, baseada no rendimento de biomassa (mg L^{-1}) por 5, 10 e 15 dias utilizando meio BBM e ELE- Pome.

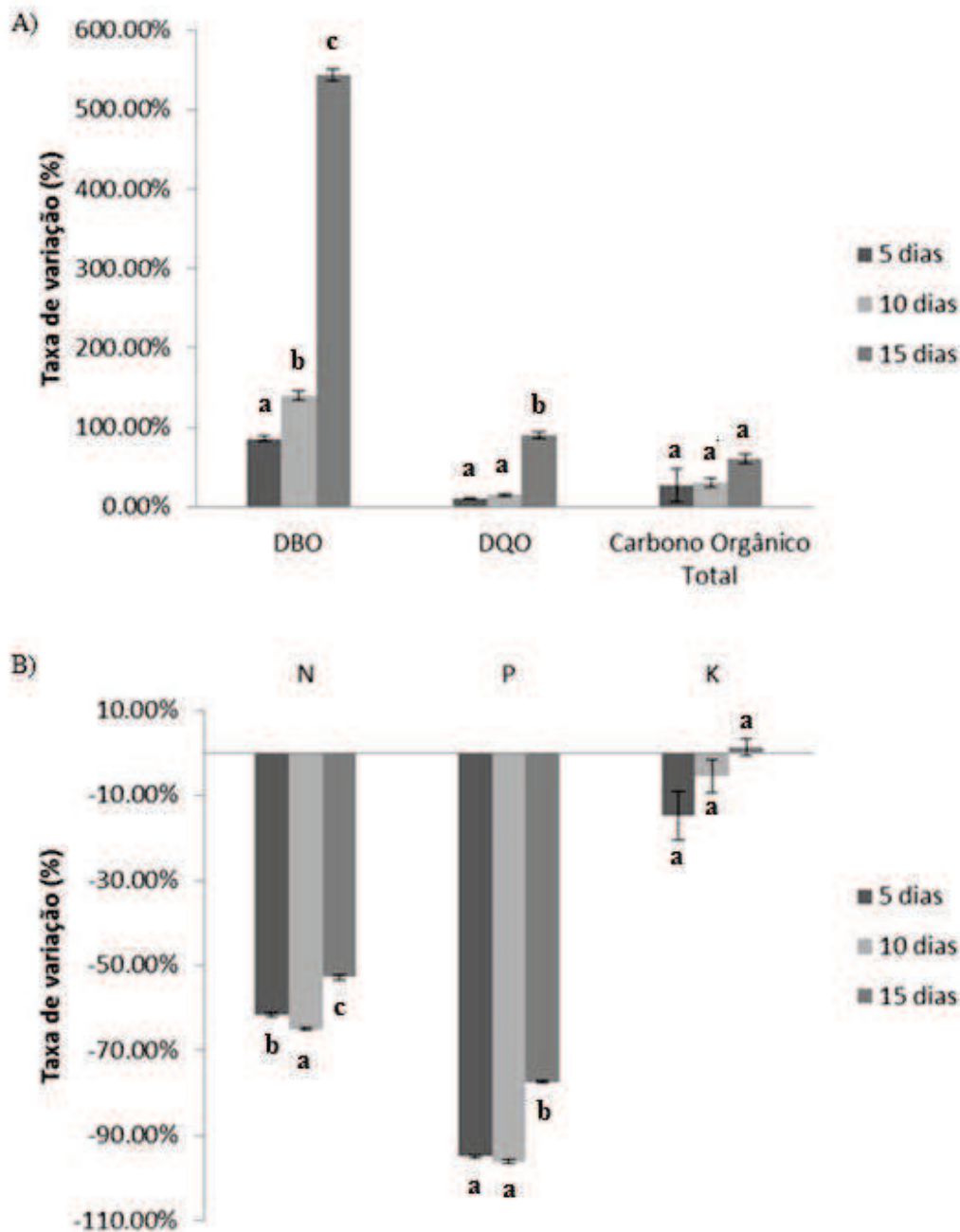


Figura 3. Percentual de variação na composição do ELE-Pome ao longo cultivo com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A análise estatística foi realizada com Anova de fator único com repetição, e foi usado o teste de Tukey para comparação entre as médias. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de cultivo avaliados ($p < 0,05$).

A partir dos dados apresentados na Figura 3, nota-se que as microalgas assimilam as fontes de nitrogênio e fósforo do meio, sendo as maiores reduções observadas nos períodos de cultivo que coincidem com a fase exponencial de crescimento (10 dias). Observou-se também que em todos os cultivos houve

elevação na DBO e DQO com o aumento no tempo de cultivo, os quais foram mais acentuados após o final da fase exponencial de crescimento algal. Pode-se hipotetizar a contribuição de dois fatores para esse fenômeno: i) O acúmulo de compostos orgânicos no meio de cultivo, secretados pelas microalgas, em especial carboidratos; ii) A baixa eficiência de remoção de células mortas e debris celulares que se acumulam ao longo do tempo de cultivo pelo método de colheita de biomassa empregado (centrifugação).

Pode-se perceber que há aumento nos parâmetros orgânicos ao longo do tempo de cultivo, sendo mais acentuado após o término da fase de crescimento algal exponencial. Por outro lado, as concentrações de nitrogênio e fósforo apresentaram reduções significativas, enquanto a concentração do potássio não variou significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo de cultivo. As taxas de remoção de nitrogênio total atingiram mais de 64,13% para *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40. Cultivando *Chlamydomonas sp.* em Pome, Ding et al. (2016) obtiveram, taxas de remoção de nitrogênio amoniacal e nitrogênio total equivalentes a 100% e 72,97% da concentração inicial, respectivamente. A variação da concentração de fósforo total nos cultivos da cepa foi de 96%, obtido no tempo de 5 dias, o que equivale a uma redução $19,32 \text{ mgL}^{-1}$ de fósforo (Figura 3B). Ding et al. (2016) reportaram 63,53% de remoção de fósforo total por uma cepa de *Chlamydomonas sp.* em Pome diluído com água destilada.

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que os pontos de máxima produtividade de biomassa e de máxima remoção de nutrientes inorgânicos coincidem, determinando assim um único ponto ótimo de colheita. Esses achados são importantes, pois maximizam as vantagens da exploração biotecnológica do cultivo de microalgas acoplado à agroindústria de palma-de-óleo. Estudos futuros focados na análise da composição da biomassa algal produzida em ELE-Pome auxiliarão na identificação e valoração de potenciais bioprodutos que poderão ser obtidos a partir dessas microalgas.

Conclusões

Conclui-se que o Efluente da Lagoa de Estabilização do Pome (ELE-Pome) pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40, sem necessidade de suplementação de NPK.

Verificou-se que há remoção significativa de nitrogênio e fósforo do ELE-Pome, principalmente durante a fase de crescimento exponencial das células, período que coincide a máxima produtividade de biomassa algal.

Apoio financeiro

Finep, Capes e Embrapa.

Referências

ABRAPALMA, **A palma no Brasil e no mundo**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo/>> Acesso em: 20 maio 2016.

BRUNALE, P. P. de M. O isolamento das microalgas e o seu cultivo em vinhaça para produção de biocombustíveis e biorremediação. Curitiba: União Latino-americana de Tecnologia, 2014.

CHIU, S.; KAO, C.; CHEN, T.; CHANG, Y.; KUO, C.; LIN, C. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 184, p. 179–189, 2015.

DING, G. T.; YAAKOB, Z.; TAKRIFF, M. S.; SALIHON, J.; RAHAMAN, M. S. A. Biomass production and nutrients removal by a newly-isolated microalgal strain *Chlamydomonas* sp in palm oil mill effluent (POME). **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 4888–4895, 2016.

LEDDA, C.; IDÀ, A.; ALLEMAND, D.; MARIANI, P.; ADANI, F. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, Amsterdam, v. 12, p. 68–73, 2015.

LEE, E.; ZHANG, Q. Integrated co-limitation kinetic model for microalgae growth in anaerobically digested municipal sludge centrate. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, Amsterdam, v. 18, p. 15–24, 2016.

SAMBUSITI, C.; BELLUCCI, M.; ZABANIOTOU, A.; BENEDUCE, L.; MONLAU, F. Algae as promising feedstocks for fermentative biohydrogen production according to a biorefinery approach: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 44, p. 20–36, 2015.

SASONGKO, N. A.; NOGUCHI, R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. In: BAKAR, R. B. A.; FROOME, C. **Energy Procedia**. Amsterdam: Elsevier, 2015. v. 68. p. 226–235. Apresentado no: 2nd International Conference on Sustainable Energy Engineering and Application (ICSEEA); Sustainable Energy for Green Mobility, 2014.

WU, L. F.; CHENG, P. C.; HUANG, A. P.; LEE, C. M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 113, p. 14–18, 2012.