

Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* em efluente doméstico para a produção de lipídeos

E. TREVISAN¹, K. B. Z. F. BRANCO¹, P. MORO² e P. A. ARROYO¹

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica

E-mail para contato: eliastrevisan@yahoo.com.br

RESUMO – A utilização de microalgas para a produção de biodiesel pode ser aliada ao tratamento de efluentes doméstico, industrial e agrícola, com acúmulo significativo de lipídeos. Este trabalho teve como objetivo utilizar efluente de tratamento de esgoto doméstico, como fonte de nutrientes no cultivo de *Chlorella vulgaris*. Foi avaliado a remoção de material particulado suspenso e microrganismos presentes, bem como a diluição do efluente no inóculo. O uso de tratamento para a remoção de microrganismos e material particulado influenciou o crescimento da microalga. Os cultivos diluídos em partes iguais entre inóculo e efluente se diferenciaram na ausência e presença de tratamento com luz ultravioleta e filtração. Sem tratamento foi alcançado 0,42 g.L⁻¹, enquanto que a filtração elevou a produção para 0,85 g.L⁻¹ e filtração seguida de exposição a luz ultravioleta levou a uma produção de 0,75 g.L⁻¹. Alcançando teores de lipídeos totais de 12,6, 21,3 e 24,6%, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

Durante as ultimas décadas tem-se levantado questionamentos quanto ao real nível das atuais reservas de petróleo. Juntamente as questões que envolvem o volume de petróleo está a oscilação dos seus preços no mercado internacional e, como apontam Campbell e Laherrère (1998), os preços são resultados de reações emocionais e políticas. Um exemplo é o que ocorreu entre os anos de 1973 e 1979, período em que os preços do petróleo dispararam devido ao embargo Árabe. Campbell e Laherrère (1998) ainda apontam para um aumento ilusionista nas reservas, promovido por seus controladores, pois estes na maioria dos casos são governos que comandam as principais empresas petrolíferas, sendo muitas vezes utilizadas como braço político ou geopolítico. A partir disto, tem-se estudado alternativas para substituir os combustíveis fósseis como principal fonte energética, com preferência para materiais que sejam provenientes de fontes renováveis. Assim, as matérias-primas que tem se destacado inicialmente são plantas oleaginosas, tais como pinhão manso (SALVIATO e ARROYO, 2012), canola, girassol, soja, palma, cambre e algodão para a produção de biodiesel e cana-de-açúcar para produção de etanol. No entanto, a utilização destas oleaginosas é limitada pelo baixo teor de lipídeos em sua biomassa, geralmente abaixo de 5% (CHISTI, 2008). Outro desafio no uso de plantas oleaginosas é a demanda que estas possuem por terras aráveis, nutrientes e recursos hídricos da produção de alimentos (CHISTI, 2007; BHATNAGAR *et al.*, 2011).

Buscando alternativas para a redução da disputa alimentos versus biocombustíveis e substituição ao menos parcial dos combustíveis fósseis, iniciaram-se os estudos com microalgas, pois estas são microrganismos fotossintéticos com requerimentos nutricionais relativamente simples e cuja biomassa pode ser empregada na produção de bioenergia, alimentação humana e animal, condicionador de solo e biocompostos de elevado valor (CHISTI, 2007; ANDRADE e COSTA, 2008; CHISTI, 2008).

As microalgas são microrganismos heterogêneos, usualmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos e fotoautotróficos, podendo ainda, ser procarióticos ou eucarióticos (OLAIZOLA, 2003). As microalgas por meio de fotossíntese convertem água, dióxido de carbono e luz em oxigênio e biomassa (COSTA e DE MORAIS, 2011), sendo a energia armazenada na forma de óleo, carboidrato e proteína (DEMIRBAS, 2011), podendo algumas espécies apresentar elevado teor de lipídeos em sua massa seca (CAI, PARK e LI, 2013). Neste sentido, vários estudos têm buscado determinar as melhores condições nutricionais que sejam mais apropriadas para que se consiga o maior rendimento na produção de bioprodutos desejados, sejam eles, lipídeos, carboidratos ou proteínas.

A maior parte dos custos da produção de microalgas são as fontes de nutrientes (VONSHAK, 1997), podendo variar de acordo com a fonte dos nutrientes. Assim, tem-se estudado alternativas para a nutrição das microalgas com a utilização de águas residuárias de estações de tratamento de esgoto doméstico (BHATNAGAR *et al.*, 2011), águas residuárias de atividades agropecuárias (KUMAR, MIAO e WYATT, 2010) e do setor industrial.

Portanto, este trabalho buscou avaliar a utilização de efluente de reator anaeróbio do tipo RALF, empregado no tratamento de esgoto doméstico, como meio alternativo para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*. O uso do tratamento anaeróbio tem sido muito utilizado no Brasil, por sua eficiência na remoção de matéria orgânica e custo operacional reduzido. No entanto, tem como principal limitação a baixa remoção dos principais nutrientes causadores de aflorações de algas em mananciais. Desta forma, é possível aliar o tratamento de esgoto doméstico com o potencial produtivo de biomassa como matéria-prima para biocombustíveis. Assim, foram estudadas as condições iniciais de cultivo, obtendo-se a cinética de crescimento da microalga neste meio de cultivo alternativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microalga *Chlorella vulgaris*

A cepa de *Chlorella vulgaris* foi gentilmente cedida pela Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, pesquisadora do Instituto Nacional de Tecnologia (INT) - RJ.

Os cultivos de reprodução e manutenção foram conduzidos no Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio), no Departamento de Engenharia Química da Universidade

Estadual de Maringá. Os ensaios foram realizados com meio de cultivo sintético DM (WATANABE, 1960), em ambiente com clima controlado a 25 ± 2 °C. O mesmo foi mantido com fotoperíodo de 24 h e borbulhamento por injeção de ar fornecido por compressor da marca Schulz. Estes cultivos forneceram inóculo para os cultivos utilizando efluente como meio de cultivo.

2.2. Coleta e preparo do efluente de reator anaeróbio

Efluente de reator anaeróbio foi coletado na estação de tratamento de esgoto, ETE-Sul, da companhia de saneamento do Paraná – Sanepar, localizada na cidade de Maringá-PR. Esta estação é responsável pelo tratamento da parte sul da cidade de Maringá e o efluente foi coletado e acondicionado em tambor de 30 L, sendo transportado até o LCHBio, onde foi preparado para o cultivo de microalgas.

O cultivo com efluente doméstico foi usado em três condições diferentes. Inicialmente, o efluente foi utilizado nas condições em que foi coletado, ou seja, sem nenhum tipo de tratamento para a remoção de material particulado e microrganismos, sendo nomeado de *in natura*. Na segunda condição foi usada filtração de para a remoção de material com tamanho maior de $7\mu\text{m}$, sendo nomeado de filtrado. Na terceira condição de cultivo foi aplicada a filtração de material com tamanho maior de $7\mu\text{m}$, seguida com desinfecção com luz ultravioleta. Ainda, para comparação, a microalga foi cultivada em meio sintético DM.

As condições iniciais acima mencionadas foram distribuídas em quatro concentrações diferentes. As concentrações foram de 7:1, 6:2, 5:3 e 4:4 (v/v) de esgoto doméstico:inóculo, enquanto que o cultivo conduzido com meio sintético foi utilizado uma concentração de 8:1:1 (v/v/v) de água desionizada:inóculo:solução de nutrientes. Os cultivos foram preparados em erlenmeyers de 1L e posteriormente colocados em ambiente com temperatura controlada (25 ± 1 °C), com fotoperíodo de 24 h fornecido por quatro lâmpadas fluorescente de 20 watts cada, totalizando 5.000 lux. O meio foi agitado com a injeção de ar comprimido fornecido por um compressor da marca Schulz, com uma vazão de $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Ao final do período de cultivo fez-se a colheita utilizando floculação prévia da biomassa, com o flocculante natural Tanfloc – SL, o qual é produzido pela empresa Tanac e gentilmente doado para os estudos. A operação de floculação foi seguida por decantação e filtração em tela de 20 mesh, para, então, obter-se a biomassa algal. Posteriormente, a secagem da biomassa algal foi realizada em estufa, na temperatura de 60 °C, por um período de 24 horas. Após a biomassa seca foi determinado o teor de lipídeos totais produzidos pela biomassa, utilizando a metodologia de extração a frio desenvolvida por Bligh e Dyer, (1959) e adaptada de Rodríguez et al., (2007).

2.3 Análise dos dados

Após a obtenção dos resultados foi realizada a análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos com posterior teste de Tukey (*post-hoc*), utilizando o *Software* STATISTICA® versão 7.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento da microalga em diferentes condições de cultivo

A avaliação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, utilizando efluente de reator anaeróbio sob as diferentes concentrações de efluente:inóculo, bem como do uso de tratamentos visando a remoção de material suspenso e microrganismos que possam competir por luz, nutrientes, ou ainda, predação é mostrado na Figura 1, 2 e 3.

Na Figura 1 a cinética de crescimento da *C. vulgaris* utilizando o efluente *in natura* não apresenta um crescimento consistente, pois o efluente de reator anaeróbio possui uma variedade de protozoários e bactérias que competem por luz e nutrientes e microrganismos que se alimentam de microalgas (CHO *et al.*, 2011). Como mostrado, o aumento da concentração inicial de efluente não resultou melhoria nos valores de crescimento algal, demonstrando a necessidade de realizar tratamento para a remoção do material suspenso e microrganismos. O teste de Tukey mostrou que não ocorreu diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os cultivos com concentração de 4:4 e 5:3 e 6:2 ao longo do período de cultivo, mas se diferenciaram do cultivo utilizando concentração 7:1 e meio sintético DM.

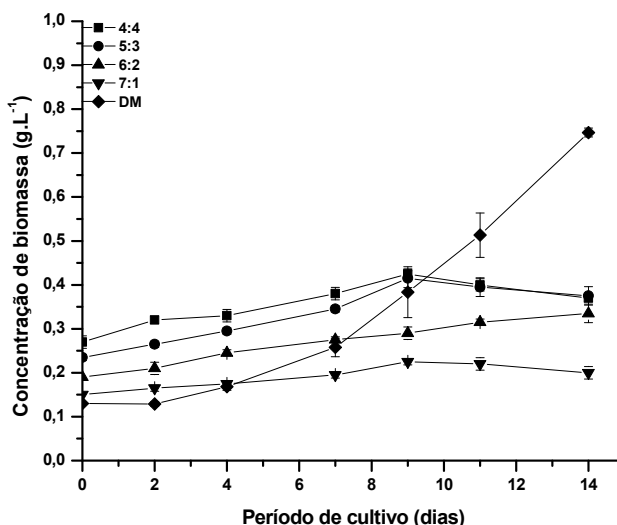


Figura 1 – Concentração da biomassa produzida pela microalga *Chlorella vulgaris* em função do tempo de cultivo em diferentes concentrações de efluente *in natura*: inóculo e meio DM.

Também pode ser observado que após o 9º dia de cultivo começa a ocorrer a redução na concentração da biomassa, diferente do que ocorre com a microalga cultivada com meio sintético

DM, que permaneceu ascendente até o final dos ensaios. O final da fase de crescimento também coincide com a remoção total do nitrogênio amoniacal no cultivo com efluente (dados não mostrados), que pelas características do pH é a principal fonte de nitrogênio e que apresenta um maior consumo.

A aplicação de pré-tratamento de filtração de material suspenso com tamanho maior que 7 μm resultou em melhoria significativa nos resultados de crescimento como mostra a Figura 2.

O teste Tukey mostrou que os cultivos com concentrações de 4:4 e 5:3 de efluente, não possuem diferença significativa ($p > 0,05$) entre si até o 11º dia, mas este possui diferença significativa quando foi comparado com DM, indicando que pode o meio alternativo pode substituir os meios tradicionais, para cultivos com período inferior a 11 dias. Entretanto, o cultivo 6:2 não possui diferença significativa em relação ao meio sintético DM, durante todo o experimento, indicando que esta condição também pode ser utilizada para a substituição em períodos maiores de cultivo.

Os cultivos com concentração 6:2 e 7:1 mantiveram um período de crescimento exponencial maior, até o fim do cultivo, diferentemente das demais concentrações (4:4, 5:3) que a partir do 11º dia estabilizaram o crescimento. Estes resultados também estão associados ao completo consumo do nitrogênio amoniacal presente no meio de cultivo.

A diferença na produção com efluente filtrado e *in natura* fica claro, pois o uso de meio filtrado atingiu 0,81 g.L^{-1} , bem superior ao obtido com material *in natura*, que foi de 0,43 g.L^{-1} . Estes resultados mostram que a presença de material suspenso e microrganismos reduzem a disponibilidade de luz e nutrientes para as microalgas, influenciando a produção de biomassa algal.

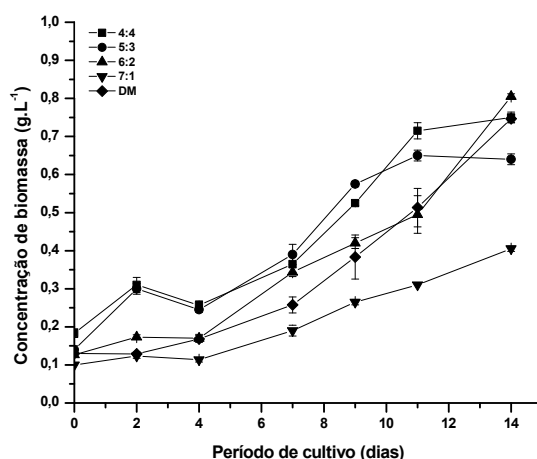


Figura 2 – Concentração da biomassa produzida pela microalga *Chlorella vulgaris* em função do tempo de cultivo em diferentes concentrações de efluente in natura filtrado:inóculo e meio DM.

Na figura 3 é mostrado os resultados da desinfecção do efluente usado como meio de cultivo, tendo como objetivo a eliminação de microrganismos. De maneira geral, pode ser verificada uma evolução nos resultados em relação aos demais cultivos. Ainda, na Figura 3 é mostrado que os melhores resultados de crescimento foram obtidos para as concentrações 6:2, 5:3 e 4:4. A partir do 9º dia o crescimento nas concentrações 4:4 e 5:3 verifica-se uma tendência de estabilização da produção, enquanto que para a concentração 6:2 esta condição foi alcançada a partir do 11º dia. Nestas condições de cultivo, foi obtida uma produção máxima de $0,86 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa seca.

Ainda, pode ser observado que o cultivo com maior concentração (7:1), a exemplo do que ocorreu nos dois casos anteriores, teve um desempenho bastante limitado com uma diferença significativa ($p>0,05$) no final da produção (11-14º dia), indicando que a concentração de efluente na solução de cultivo é um fator limitante do crescimento para as três condições de tratamento.

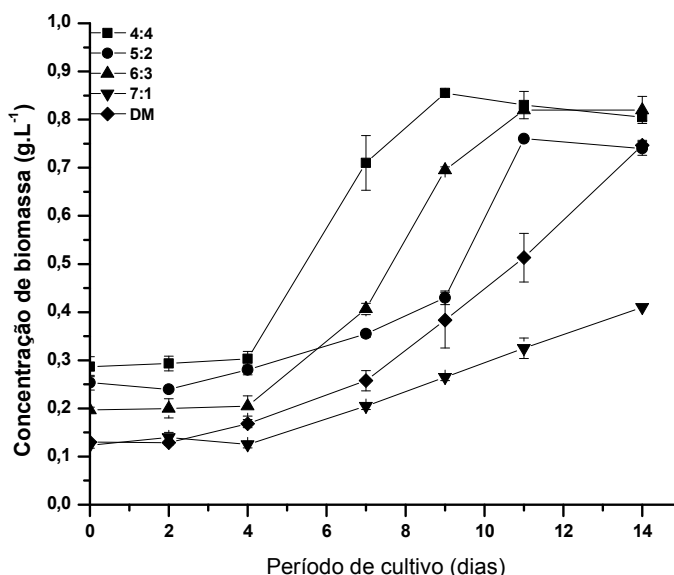


Figura 3 – Concentração da biomassa produzida pela microalga *Chlorella vulgaris* em função do tempo de cultivo, em diferentes concentrações de efluente *in natura* filtrado + UV: inóculo e meio DM.

3.2 Teor de lipídeos totais

A produção de lipídeos totais obtidos da biomassa de *C. vulgaris* produzida com meio sintético DM, alcançou um teor de 21,2% valor que se encontra de acordo com a literatura que aponta para um máximo de 22%. No entanto, com a biomassa produzida em condições *in natura*, os valores se destacaram por estarem abaixo daqueles obtidos com os demais tratamentos como

mostrado na Tabela 1. Este efeito se deve a maior presença de sólidos suspensos que possam ainda estar dispersos no meio e microrganismos com menor teor de lipídeos.

Tabela 1 – Porcentagem de lipídeos totais na biomassa de microalga *C. vulgaris*.

	<i>In natura</i>	Filtrado	Filtrado + UV
7:1	12,7	14,05	17,7
6:2	12,9	20,3	22,2
5:3	13,6	22,2	23,9
4:4	12,6	21,3	24,6

Os lipídeos totais produzidos nas demais condições de cultivo tiveram valores que oscilaram de 14,1 a 24,06%. E o teste de Tukey demonstrou que não há diferença significativa nos valores obtidos, quando comparado as diferentes concentrações dentro dos tratamentos. Se analisado os tratamentos, ocorrem diferenças significativas do *in natura* em relação aos demais, exceto os que utilizaram concentração 7:1. Isto demonstra que a utilização do meio alternativo pode substituir o meio sintético na produção de lipídeos totais. Os cultivos com maior concentração (7:1) de efluente tiveram menor teor de lipídeos por estarem em fase de crescimento e por estarem com um período curto de limitação do nitrogênio amoniacal. A limitação de nitrogênio faz com que ocorra um aumento no acúmulo de lipídeos. Os dados demonstram claramente que a otimização das condições de cultivo são importantes, assim como verificado por Cho et al., (2011).

4. CONCLUSÕES

A utilização de efluente de estação de tratamento de esgoto doméstico como meio alternativo no cultivo de microalgas é viável e pode substituir a utilização de meio de cultivo sintético, além de contribuir na remoção de importantes poluentes de mananciais tais como o nitrogênio amoniacal. No entanto, para a sua utilização é necessário realizar um pré-tratamento para remoção de material suspenso e microrganismos, os quais limitam o crescimento da microalga.

A biomassa de *Chlorella vulgaris* produzida em meio de cultura alternativo apresentou teores de lipídeos totais muito próximos ao que foi produzido com meio convencional DM. O teor de lipídeos totais máximo alcançado com a utilização de efluente Filtrado+UV, sendo de 24,6% (4:4), seguido pela utilização de efluente Filtrado, com 22,2% (5:3), enquanto que com efluente *in natura* o teor de lipídeos totais foi de apenas 13,6% (5:3).

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

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

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

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

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 5, 2007. ISSN 0734-9750.

_____. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.

CHO, S. et al. Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 18, p. 8639-8645, 2011.

COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2-9, 2011.

DEMIRBAS, A. Biodiesel from oilgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3541-3547, 2011.

KUMAR, M. S.; MIAO, Z. H.; WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6012-6018, 2010. ISSN 0960-8524.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003. ISSN 1389-0344.

WATANABE, A. LIST OF ALGAL STRAINS IN COLLECTION AT THE INSTITUTE OF APPLIED MICROBIOLOGY, UNIVERSITY OF TOKYO. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 283-292, 1960.