

XI-029 - PRODUÇÃO DE MICROALGAS A PARTIR DO CULTIVO COM SUPLEMENTAÇÃO DE GLICERINA E MEIO EFLUENTE

Lilian de F. Ferreira da Silva⁽¹⁾

Graduanda de Química Industrial, Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), RS.

Marcondes M. Pacheco⁽¹⁾

Engenheiro Ambiental pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Mestre em Tecnologia Ambiental pela UNISC.

Michele Hoeltz⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pós-doutoranda na UNISC.

Maria S. A. Moraes⁽¹⁾

Química pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Doutora em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pós-doutoranda na Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

Rosana de C. de S. Schneider⁽¹⁾

Química pela Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Doutorado em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Endereço⁽¹⁾: Avenida Independência, 2293 - Santa Cruz do Sul – RS - CEP: 96815-900 - Brasil - Tel: (51) 3717-7300 - e-mail: lilianferreira93@hotmail.com

RESUMO

A versatilidade de processos biotecnológicos empregando microalgas viabiliza a sua aplicação no tratamento de diferentes tipos de águas residuárias e de efluentes gasosos, além de permitir a integração da biorremediação com a produção de biomassa para a conversão em biocombustíveis. A previsão até 2020 de geração de glicerina, um sub-produto derivado da produção de biodiesel, é de 2,7 milhões de toneladas em todo o mundo. Esse resíduo deve ser eficientemente transformado, a fim de alcançar a sustentabilidade do segmento produtor de biodiesel. Mesmo as microalgas necessitando essencialmente de macronutrientes como o nitrogênio, o fósforo e o potássio (NPK), através de processos heterotróficos de fermentação, elas são capazes de converter a glicerina e produzir diversos bioprodutos, tais como 1,3 propanodiol, lipídios e pigmentos, oferecendo uma alternativa para o gerenciamento desse resíduo. A abundância e o custo relativamente baixo da glicerina são alguns dos principais atrativos para seu uso como fonte de carbono suplementar alternativo para microalgas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento da glicerina no cultivo mixotrófico da microalga da espécie *Scenedesmus* sp. em comparação com o cultivo com NPK. Os resultados obtidos mostraram a possibilidade de utilização da glicerina como fonte alternativa de carbono, no cultivo da microalga. Esse fato, aliado a promoção da biorremediação dos efluentes, e posterior produção de biocombustíveis, torna o emprego desse resíduo uma forma sustentável na obtenção de produtos com alto valor agregado. Os cultivos com NPK apresentaram valores de densidade celular maiores, como esperado. Os efeitos da utilização de glicerina e NPK, de forma conjunta, devem ser ainda analisados como um sistema promissor para aumento de rendimento da biomassa com potencial para obtenção de biocombustíveis.

PALAVRAS-CHAVE: *Scenedesmus* sp., glicerina, biomassa, densidade, rendimento.

INTRODUÇÃO

A utilização de combustíveis fósseis causa impactos ambientais, colaborando para emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa, sendo assim percebe-se a importância dos estudos em busca de fontes alternativas para produção de energia.¹

O cultivo de microalgas é considerado uma alternativa como fonte energética, através da produção de biocombustíveis, uma vez que a biomassa proveniente deste meio é rica em lipídeos, carboidratos e ácidos graxos, que são fundamentais na produção de biodiesel, por exemplo. Os lipídeos produzidos pelas microalgas

e encontrados em sua biomassa são classificados de acordo com o número de carbono, sendo os ácidos graxos com cadeia de 14-20 carbonos utilizados na produção do biodiesel.²

Esses microrganismos podem ser empregados também no tratamento de efluentes ricos em componentes que contenham fósforo e nitrogênio. Ao consumirem esses nutrientes as microalgas consequentemente promovem o tratamento desse efluente, promovendo seu descarte adequado.³ O uso de microalgas para biorremediação apresenta diversas vantagens, tais como: utilização de energia barata (luz solar); produção de biomassa para alimentação animal; obtenção de produtos de alto valor agregados e de química fina.⁴

O metabolismo da microalga pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. No cultivo mixotrófico ocorre o metabolismo autotrófico e o heterotrófico juntos, ou seja, o crescimento da microalga se dá pela presença de luz e realização de fotossíntese, juntamente com a disponibilidade dos nutrientes.⁵ Para o processo de fotossíntese, as microalgas necessitam também de quantidades específicas de nutrientes essenciais, o que inclui macroelementos como carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, ferro; oligoelementos como cobalto, molibdênio e manganês, e vitaminas, como a cianocobalamina e tiamina, a fim de produzirem biomassa e multiplicarem-se.⁶ Entretanto, em situações de escassez de nutrientes, são capazes de adaptarem-se às condições nutricionais do meio, armazenando quantidades em excesso de determinados elementos para uso posterior, ou ainda, ajustando a composição de sua biomassa.⁷

O glicerol, também conhecido como glicerina ou propano-1,2,3-triol, é um produto químico que tem uma multiplicidade de aplicações industriais.⁸ Sendo um sub-produto derivado da produção de biodiesel, a previsão é de que até 2020, 2,7 milhões de toneladas de glicerina serão geradas em todo o mundo, as quais devem ser eficientemente transformadas, a fim de alcançar a sustentabilidade do segmento produtor de biodiesel.⁹

Através de processos heterotróficos de fermentação, microalgas são capazes de converter glicerol e produzir diversos bioprodutos, tais como 1,3 propanodiol, lipídios e pigmentos, oferecendo uma alternativa para o gerenciamento da glicerina enquanto resíduo.¹⁰ A abundância e o custo relativamente baixo desse resíduo são alguns dos principais atrativos para seu uso como fonte de carbono suplementar alternativo para microalgas.¹¹

A fim de aumentar a concentração lipídica na biomassa para se obter um maior rendimento na produção de biocombustíveis e incrementar a densidade celular para maior eficiência na biorremediação do efluente, este trabalho teve como objetivo o aproveitamento da glicerina oriunda da produção de biodiesel comparada ao uso de NPK, no cultivo mixotrófico da microalga da espécie *Scenedesmus* sp. Assim como, proporcionar uma alternativa para o tratamento do efluente produzido na Estação de Tratamento de Efluente (ETE/UNISC) na Universidade de Santa Cruz do Sul e posterior utilização da biomassa remanescente do processo na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol.

MATERIAIS E MÉTODOS

A microalga testada nos experimentos foi cultivada a partir do efluente da ETE/UNISC. O cultivo foi realizado primeiramente em cerca de 2 L de efluente para obtenção do inóculo.

Para realização dos experimentos foram montados dois sistemas com variações de fontes nutritivas para o cultivo da microalga da espécie *Scenedesmus* sp.. Os nutrientes utilizados para os ensaios foram: glicerol oriundo da produção de biodiesel e para comparação, um fertilizante a base dos macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio (NPK).

A partir de um inóculo de $4,75 \times 10^6$ cel/mL, padronizado a partir de uma curva de calibração, os experimentos foram iniciados em erlenmeyers de 400 mL, em triplicatas. Após 48 h de cultivo iniciais, foi adicionada a um dos sistemas as concentrações de 1%, 3% e 5% de NPK e ao outro sistema 1, 3 e 5 g/L de glicerol, ambos os sistemas foram monitorados a partir de um controle onde o cultivo foi feito somente com o efluente.

Além dos suplementos nutricionais o sistema teve condições de temperatura controlada em torno de 25 °C e recebeu iluminação artificial constante. O incremento da densidade celular foi acompanhado diariamente

através de leituras no espectrofotômetro (682 nm). As medidas foram interrompidas ao se observar o decréscimo da densidade celular.

A densidade celular foi padronizada para ser utilizada como medida de crescimento de microalgas podendo ser interpretada como sendo o incremento celular diário dos cultivos. A relação entre a densidade celular e a DO_{682} foi pré-determinada através da regressão linear dos valores de absorbância correspondente a dez diluições partindo de uma concentração inicial de referência obtido por contagem em câmara de Neubauer. A densidade celular máxima (DCM) foi definida como sendo a máxima concentração celular em células por mililitro de cultivo quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento.

A recuperação de biomassa de microalgas para os cálculos de rendimento dos cultivos foi feita por centrifugação a 3.500 rpm por 15 minutos, as amostras recuperadas de biomassa foram secas até peso constante em estufa a 60°C por 24 horas para remoção do excesso de água e subsequente avaliação do rendimento em peso seco por gravimetria em balança de precisão analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas primeiras 24 h de crescimento da microalga com suplementação da glicerina, pode-se observar, em todos os cultivos, a influência da grande disponibilidade de nutrientes e compostos orgânicos oferecidos pelo efluente, uma vez que o crescimento se deu de forma rápida.

A Figura 1 apresenta os perfis de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. no efluente urbano secundário coletado da ETE-UNISC com as diferentes concentrações de glicerol testadas.

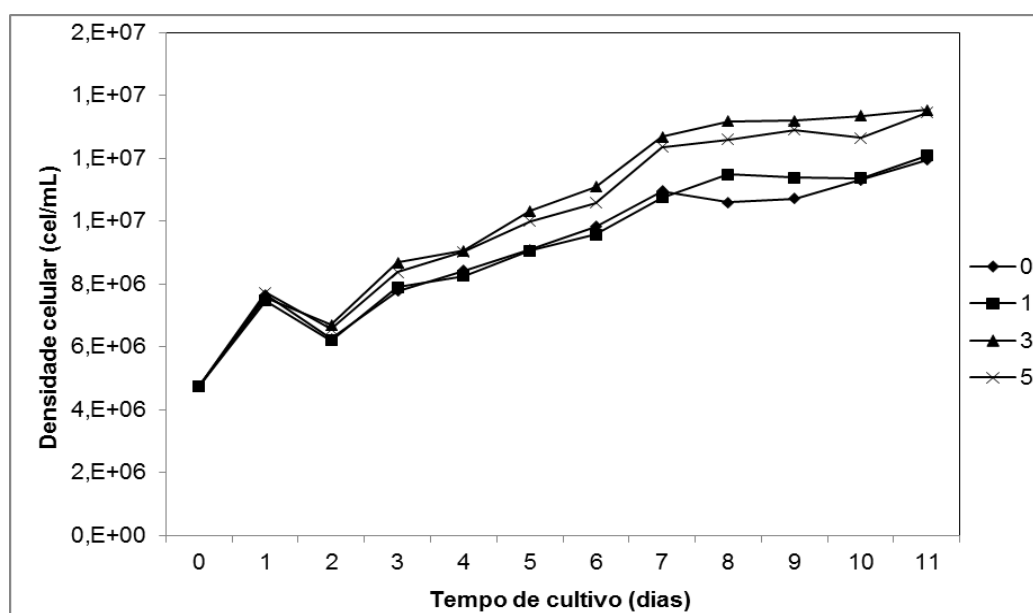


Figura 1: Densidades celulares dos cultivos submetidos a diferentes concentrações de glicerol (0 (controle), 1, 3 e 5 g/L). Os dados são expressos como média, n=3.

Ao final do segundo dia de crescimento, foram adicionadas ao meio de cultivo as soluções de glicerina nas concentrações de 0, 1, 3 e 5 g/L, ocasionando uma redução na densidade celular da microalga, pelo efeito da diluição. A partir de então, a densidade celular dos cultivos passou a exibir um comportamento crescente ao longo do tempo, até o sétimo dia de cultivo, com taxas de crescimento variando em média entre 0,088 cel/dia para o controle e 0,113 cel/dia para a condição 3 g/L de glicerina.

As densidades celulares médias foram obtidas ao final do período de cultivo como resultado de taxas crescentes de incremento celular diário. As taxas de incremento celular diário entre o 7º e o 11º dia, foram baixas se comparadas ao período anterior. Em uma possível exploração comercial em que tempo e recursos são

fatores determinantes de viabilidade, prolongar o tempo de cultivo com taxas de crescimento lentas para obtenção de um rendimento apenas residual, em termos de biomassa, pode significar aumento dos custos e inviabilização econômica da exploração.

Embora as diferenças de densidade celular não tenham sido significativas ($p > 0,05$), os cultivos demonstraram ser capazes de tolerar diferentes concentrações de glicerina e crescer, em média, mais do que o controle (0 g/L), provavelmente fazendo uso da glicerina como fonte de carbono orgânico suplementar.

A viscosidade e a turbidez conferida ao meio pela presença de glicerina em concentrações elevadas pode ter influenciado negativamente o crescimento das microalgas por dificultar a penetração da luz e assim limitar a atividade fotossintética, e ainda, o acesso (assimilação) de nutrientes e outros compostos pelas mesmas limitando o desenvolvimento de perfis heterotróficos de crescimento que são efetivamente responsáveis pela remoção de carga do meio. Ainda assim foi possível obter um crescimento melhor em relação ao controle, destacando-se as condições de 5 e 3 g/L de glicerina ambas atingindo densidades celulares médias finais de $1,345 \times 10^7$ cel/mL.

Vários microrganismos podem utilizar naturalmente o glicerol como fonte de carbono e também em substituição a alguns carboidratos, como glicose, sacarose e amido. A utilização da glicerina por microrganismos na produção de biomassa além de ser um suplemento em fontes de nutrientes, também pode aumentar a viabilidade para produção de biodiesel, agregando valor econômico a este subproduto.¹²

Os rendimentos de biomassa de *Scenedesmus* sp. obtidos dos cultivos em meios contendo diferentes concentrações de glicerol (0, 1, 3 e 5 g L⁻¹) são mostrados na Figura 2.

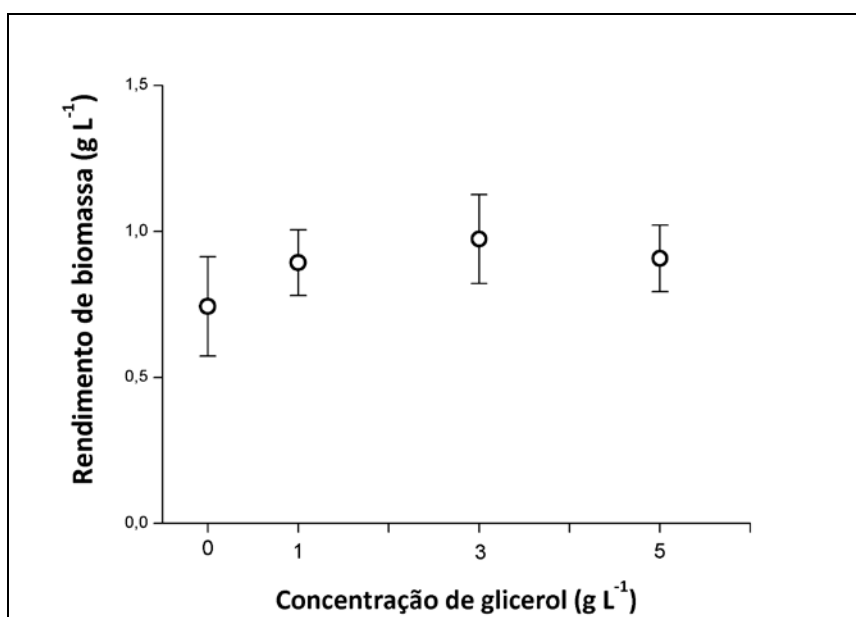


Figura 2: Rendimentos de biomassa obtidos de cultivos de *Scenedesmus* sp. em meios contendo diferentes concentrações de glicerol. Dados expressos como média \pm desvio-padrão, n = 3.

Dentre as condições testadas, a que apresentou maior rendimento de biomassa com 0,974 g/L foi aquela em que foi utilizada uma concentração de 3 g/L de glicerina, seguida das condições de 5 e 1 g/L, com rendimentos de 0,908 e 0,894 g/L de biomassa, respectivamente. Os rendimentos de biomassa obtidos nas diferentes concentrações de glicerina são condizentes com os resultados de crescimento observados para cada condição. Embora as diferenças não sejam significativas em termos de biomassa ($p > 0,05$), pode-se afirmar que a glicerina não exerce efeito inibitório no crescimento de microalgas.

De acordo com Park et al.¹³, a espécie *Scenedesmus* sp. é a mais produtiva em condições mixotróficas com rendimentos diários em termos de biomassa de 80 g/L. No entanto, os testes que envolveram a adição de glicerina ao efluente urbano resultaram nos menores índices de crescimento para essa mesma espécie.

Em todas as concentrações testadas foram obtidos resultados positivos no incremento da biomassa, sendo verificado um aumento da densidade celular mais homogêneo quando comparado à adição de NPK.

A Figura 3 apresenta os perfis de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. no efluente urbano secundário coletado da ETE-UNISC com as diferentes concentrações de NPK testadas.

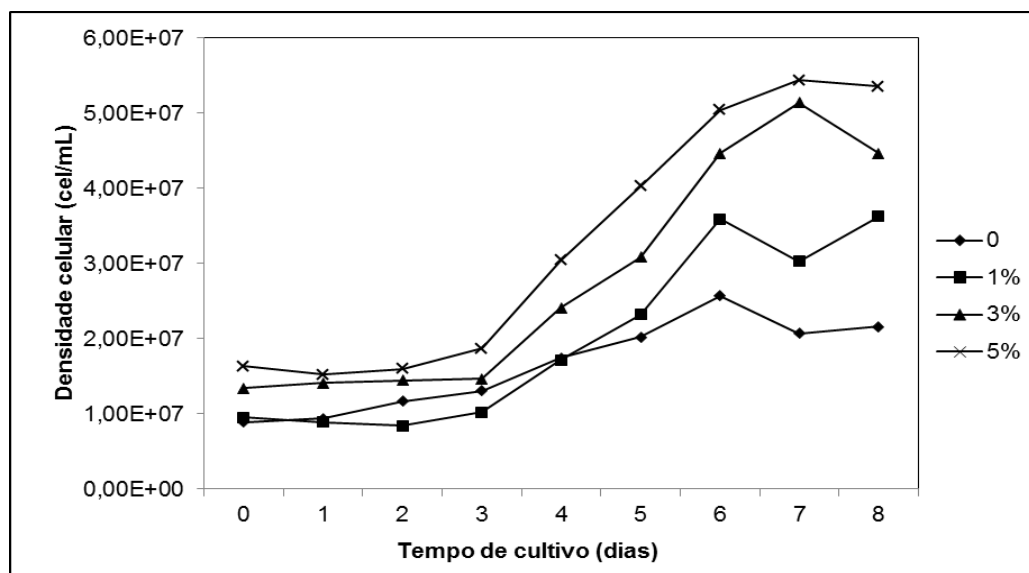


Figura 3: Densidades celulares dos cultivos submetidos a diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio (0, 1, 3 e 5%, respectivamente). Os dados são expressos como média, n=2.

Como esperado, o incremento da densidade celular nos experimentos com suplementação de NPK foram maiores quando comparados à adição de glicerina, sendo 5% de NPK a condição que apresentou o maior incremento final, de $5,3 \times 10^7$ cel/mL. Embora esses os experimentos não tenham sido concluídos, fica evidente a contribuição de NPK para o desenvolvimento das células da microalga *Scenedesmus* sp.

Os dados obtidos contribuem para a sequência dessa pesquisa com o objetivo de avaliar em um único sistema o efeito das melhores concentrações dos nutrientes NPK e glicerina sobre o rendimento e o teor de lipídeos da biomassa de *Scenedesmus* sp., para a biorremediação de efluentes e sua posterior transformação em biocombustível.

CONCLUSÕES

É possível concluir que diferentes nutrientes com distintas concentrações adicionados ao cultivo de *Scenedesmus* sp. influenciaram de forma positiva o incremento da densidade celular.

Com base nos resultados obtidos constatou-se que o emprego da glicerina nas concentrações de 3 e 5 g/L se mostrou uma alternativa viável à produção da microalga nas condições estudadas, desta forma a utilização do glicerol oriundo da fabricação de biodiesel se mostra aplicável na incrementação da densidade celular no cultivo, para um maior rendimento lipídico. O aumento na densidade celular no cultivo com suplementação de NPK foi maior na concentração de 5%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FOSCHIERA, I. P. O programa nacional de Produção e Uso do Biodiesel – Impactos e perspectivas. UFRGS. Porto Alegre, 2008. Monografia – Curso de Ciências Sociais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
2. YEN, H.W., HU, I.C., CHEN, C.Y., HO, S.H., LEE, D.J., CHANG, J.S. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products. Bioresource Technology, v. 135, p. 166–174, 2013.

3. ALVA, M.S., LUNA-PABELLO, V.M., CADENA, E., ORTÍZ, E. Green microalgae *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v.146, p.744–748, 2013.
4. SILVA, F. D. Biorremocão de Nitrogênio, Fósforo e Metais Pesados (Fe, Mn, Cu e Zn) do Efluente Hidropônico, Através do Uso de *Chlorella vulgaris*. Dissertação de Mestrado – Agroecossistemas - Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
5. MORAIS, K. C. C. Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos. Dissertação de Mestrado - Engenharia e Ciência dos Materiais – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2011.
6. CHOI, H.J., LEE, S.M. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, p.1-6, 2014.
7. MARKOU, G., VANDAMME, D., MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, v.65, n.0, p.186-202, 2014.
8. QUISPE, C.A.G., CORONADO, C.J.R., CARVALHO JR, J.A. 2013. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27(0), 475-493.
9. ZNAIGUIA, R., BRANDHORST, L., CHRISTIN, N., BELLIERE BACA, V., REY, P., MILLET, J.M.M., LORIDANT, S. Toward longer life catalysts for dehydration of glycerol to acrolein. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.196, p.97-103, 2014.
10. CHI, Z., PYLE, D., WEN, Z., FREAR, C., CHEN, S. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, v.42, n.11, p.1537-1545, 2007.
11. GUPTA, A., SINGH, D., BARROW, C.J., PURI, M. Exploring potential use of Australian thraustochytrids for the bioconversion of glycerol to omega-3 and carotenoids production. *Biochemical Engineering Journal*, v.78, p.11-17, 2013.
12. SILVA, G. P., MACK, M., CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, v.27, p.30–39, 2009.
13. PARK, K.C., WHITNEY, C., MCNICHOL, J.C., DICKINSON, K.E., MACQUARRIE, S., SKRUPSKI, B.P., ZOU, J., WILSON, K.E., O'LEARY, S.J.B., MCGINN, P.J. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: Potential applications for wastewater remediation for biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, v.24, n.3, p.339-348, 2012.