



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

RODRIGO CARVALHO DO NASCIMENTO

**CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREACTORES DE
PLACAS PLANAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E
BIORREMEDIÇÃO DE EFLUENTE DA AGROINDÚSTRIA DE ÓLEO
DE PALMA**

**GURUPI - TO
2016**



**Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

RODRIGO CARVALHO DO NASCIMENTO

**CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORRETORES DE
PLACAS PLANAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E
BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DA AGROINDÚSTRIA DE ÓLEO
DE PALMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil

Co-orientadora: Dra. Lorena Costa Garcia

**GURUPI - TO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- N244c Nascimento, Rodrigo Carvalho do .
CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIORREACTORES DE PLACAS PLANAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA E BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTE DA AGROINDÚSTRIA DE ÓLEO DE PALMA. / Rodrigo Carvalho do Nascimento. – Gurupi, TO, 2016.
55 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2016.
- Orientador: Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Coorientadora : Dra. Lorena Costa Garcia
1. Biorremediação de efluentes agroindustriais. 2. Produção de biomassa algal. 3. Fotobiorreatores. 4. Biorrefinarias. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



Ata de Defesa nº 15/2016

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RODRIGO CARVALHO DO NASCIMENTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 16 dias do mês de setembro do ano de 2016, às 14:00 horas, na sala 02 do edifício PARFOR, no campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. BRUNO DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL, da Embrapa Agroenergia, Profª. Drª. CLAUDIA CRISTINA AULER DO AMARAL SANTOS, da Universidade Federal do Tocantins, e Prof. Dr. ALEX FERNANDO DE ALMEIDA, da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RODRIGO CARVALHO DO NASCIMENTO, intitulada "**Cultivo de microalgas em fotobiorreatores de placas planas para a produção de biomassa e biorremediação de efluente da Agroindústria de óleo de palma**". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas ressalvas e correções apontadas pela banca examinadora, habilitando-o ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Bruno Dos Santos Alves Figueiredo Brasil
Embrapa Agroenergia
Orientador

Profª Drª Claudia Cristina Auler Do Amaral Santos
Universidade Federal do Tocantins
1ª Examinadora

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Universidade Federal do Tocantins
2ª Examinador

Gurupi, 16 de setembro de 2016.

Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Dedico esta dissertação aos meus pais, Márcia Iolanda Maciel de Carvalho e Dionízio do Nascimento Silva, meus maiores professores, aos meus irmãos Gustavo Carvalho do Nascimento e Lucas Carvalho do Nascimento, pessoas muito importantes na minha vida, que estão sempre do meu lado nas escolhas que faço. Sem o apoio de vocês não conseguiria obter mais essa conquista.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de fazer parte do curso de mestrado. A CAPES, pelo apoio financeiro e à Embrapa Agroenergia por oferecer a estrutura necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Bruno dos Santos Alves Figueiredo Brasil e Dra. Lorena Costa Garcia pelos ensinamentos, dedicação e paciência. Ao prof. Dr Félix Gonçalves Siqueira pela parceria e incentivo. À Maiara Sousa Fernandes, grande companheira de pesquisa. Estendo o profundo agradecimento aos membros da banca examinadora, Dra Claudia Cristina Auler do Amaral Santos e Dr. Alex Fernando de Almeida.

RESUMO

Atualmente a produção brasileira de óleo de palma ultrapassa 300 mil toneladas por ano e está em expansão. O *palm oil mill effluent* (POME) é o principal efluente líquido gerado pela indústria do óleo de palma. Para cada tonelada de óleo são necessários de 5 a 7,5 toneladas de água e cerca de 50% deste volume termina como efluente. Convencionalmente, o POME é tratado em lagoas de estabilização, que consistem de uma série de tanques aeróbios e anaeróbios que podem necessitar de até 100 dias para o tratamento. A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais constitui em um processo biológico de baixo custo capaz de acelerar a remoção de compostos inorgânicos, principalmente nitrogênio e fósforo. Além disso, é possível aproveitar a biomassa algal produzida, rica em moléculas de valor comercial, para produção de energia, ração animal e pigmentos. Deste modo, neste trabalho foi avaliada a capacidade de biorremediação e produção de biomassa em efluente de lagoa de estabilização de POME (ELE-POME) das cepas de microalgas *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 pertencentes à coleção de microrganismos e microalgas aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias da Embrapa. As microalgas foram cultivadas em fotobiorreatores *air lift* de placas planas com capacidade de 15L, utilizando iluminação artificial em ciclos de 12h/12h claro/escuro e suplementação com CO₂. Foram realizadas bateladas independentes de cultivo durante 5, 10 e 15 dias, utilizando como meios de cultivo ELE-POME e BBM (meio sintético controle). Os três períodos foram escolhidos de modo a ser avaliada a influência do tempo de cultivo na taxa de crescimento celular e na remoção dos nutrientes do meio. Com base nos resultados descritos neste trabalho, é possível concluir que o ELE-POME pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa das microalgas *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 sem necessidade de suplementação de nutrientes. O período de 5 dias em BBM foi o que apresentou melhores resultados de produtividade de biomassa sendo 286,87 mgL⁻¹dia⁻¹ para *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 e 164,67mgL⁻¹dia⁻¹ *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40. Com relação à biorremediação do efluente, os ensaios mostraram que há remoção significativa de nitrogênio e fósforo, $\geq 60\%$ e $\geq 90\%$ respectivamente, principalmente durante a fase de crescimento exponencial das células, período que coincide a máxima produtividade de biomassa algal. Estes resultados são importantes, pois aumentam a viabilidade técnico-econômica da integração do cultivo algal à cadeia de palma-de-óleo em um contexto de biorrefinaria.

Palavras-chave: Microalgas; Fotobiorreatores; Biomassa; Biorremediação.

ABSTRACT

Currently the Brazilian production of palm oil exceeds 300,000 tons per year and it is expanding. The palm oil mill effluent (POME) is the main liquid effluent generated by the palm oil industry. For each ton of oil are needed from 5 to 7.5 tonnes of water and about 50% of this volume ends up as effluent. Conventionally, POME is treated in stabilization ponds, consisting of a series of anaerobic and aerobic tanks that may require up to 100 days for treatment. The use of microalgae for wastewater treatment is a biological low-cost process, which is capable to accelerate the removal of inorganic compounds, especially nitrogen and phosphorus. Furthermore, it is possible to use algal biomass produced (rich in commercially valuable molecules) for energy production, animal feed and pigments, for example. Thus, this study evaluated the bioremediation capacity and biomass production in effluent POME stabilization pond (ELE-POME) of microalgae strains *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 and *Tetranephris sp.* Embrapa |LBA 52 from the microorganisms and microalgae collection applied to Agroenergia e Biorrefinarias of Embrapa Agroenergia. Microalgae were cultivated in photobioreactors air lift flat plates with 15L capacity, using artificial lighting in cycles of 12 h/12 h light/dark and supplemental CO₂. Independent batch cultivation were performed for 5, 10 and 15 days using as culture mediums ELE-POME and BBM (synthetic control medium). The three times were chosen in order to evaluate the influence of the cultivation time on cell growth rate and on the medium nutrient removal. Based on the results described in this work, we conclude that the ELE-POME can be used as a culture medium for the production of microalgae biomass of *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 and *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 without supplementation. The time of 5 days in BBM presented the best biomass productivity results 286.87 mgL⁻¹day⁻¹ to *Tetranephris sp.* Embrapa | LBA 52 and 164,67mgL⁻¹day⁻¹ *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa | LBA 40. Regarding the bioremediation of wastewater, the tests showed that there is significant removal of nitrogen and phosphorus, ≥60% and ≥90%, respectively, mainly during the exponential growth phase of the cells, a period that coincides with the maximum productivity of algal biomass. These results are important because they increase the technical and economic feasibility of the integration of algal cultivation to the chain of palm oil in a context of biorefinery.

Keywords: Microalgae; Photobioreactors; Biomass; Bioremediation

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 7 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 2.1 | MICROALGAS | 9 |
| 2.2 | FORMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS | 11 |
| 2.3 | APLICAÇÕES INDUSTRIAIS | 13 |
| 2.4 | PRODUÇÃO DE PALMA DE ÓLEO | 15 |
| 2.5 | O EFLUENTE DA Prensagem do Fruto da Palma de Óleo (Palm Oil Mill Effluent – POME) | 16 |
| 2.6 | MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE POME | 18 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 | MICROALGAS | 20 |
| 3.2 | MEIOS DE CULTURA | 21 |
| 3.3 | PRODUÇÃO DE INÓCULO ALGAL | 21 |
| 3.4 | CULTIVO EM FOTOBIOREACTORES <i>AIR LIFT</i> DE PLACAS PLANAS | 22 |
| 3.5 | COLHEITA DA BIOMASSA ALGAL | 24 |
| 3.6 | QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO ALGAL | 24 |
| 3.7 | ANÁLISE DOS SOBRENADANTES DOS CULTIVOS ALGAIS | 25 |
| 3.8 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 26 |
| 4 | RESULTADOS | 27 |
| 4.1 | CULTIVO DA CEPA <i>CHLAMYDOMONAS BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40 EM FOTOBIOREACTORES DE PLACAS PLANAS | 27 |
| 4.2 | AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE PÓS-CULTIVO DA CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40 | 29 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS DO ELE-POME APÓS O CULTIVO E COLHEITA DA BIOMASSA DA CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40 | 32 |
| 4.4 | CULTIVO DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP.</i> EMBRAPA LBA 52 EM FOTOBIOREACTORES DE PLACAS PLANAS | 34 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE PÓS-CULTIVO DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP.</i> EMBRAPA LBA 52 | 36 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS DO ELE-POME APÓS O CULTIVO E COLHEITA DA BIOMASSA DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP.</i> EMBRAPA LBA 52 | 39 |
| 5 | DISCUSSÕES | 41 |
| 6 | CONCLUSÕES | 48 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |
| | ANEXO | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO GERAL DE DIFERENTES FONTES DE ALIMENTOS HUMANOS E MICROALGAS..... | 10 |
| TABELA 2 - QUADRO COMPARATIVO ENTRE O METABOLISMO ALGAL AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO E MIXOTRÓFICO..... | 11 |
| TABELA 3 - METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS QUÍMICOS DO ELE-POME, ANTES E APÓS O CULTIVO DAS MICROALGAS..... | 26 |
| TABELA 4 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM MG/L/DIA DA CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40..... | 29 |
| TABELA 5 - ANÁLISE DOS SOBRENADANTES PÓS-COLHEITA DA CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40..... | 30 |
| TABELA 6 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA EM MG/L/DIA DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP</i> EMBRAPA LBA52..... | 36 |
| TABELA 7 - ANÁLISE DO EFLUENTE DE CULTIVO DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP</i> . EMBRAPA LBA5237 | |
| TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PADRÕES DE QUALIDADE DE ÁGUA DOCE CLASSE I, SEGUNDO RESOLUÇÃO N° 357/05 CONAMA E AS COMPOSIÇÕES DO PALM OIL MILL EFFLUENT ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO DE CINCO DIAS COM <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40 E <i>TETRANEPHRIS SP</i> EMBRAPA LBA 52. | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - COMPARAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE ÓLEO VS TERRITÓRIO REQUERIDO PARA PRODUÇÃO, ENTRE AS FONTES OLEAGINOSAS TRADICIONAIS E AS MICROALGAS..... | 10 |
| FIGURA 2 - TIPOS DE FOTOBIOREACTORES | 12 |
| FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE PALMA..... | 15 |
| FIGURA 4 - LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO DE POME EM AGROINDÚSTRIA DE PALMA-DE-ÓLEO... | 16 |
| FIGURA 5 - <i>CHLAMYDOMONAS BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA 40 (A E B) E <i>TETRANEPHRIS SP.</i> EMBRAPA LBA52 (C E D).. | 20 |
| FIGURA 6 – LAGOAS DE ESTABILIZAÇÃO DE POME NA AGROINDÚSTRIA DENPASA (SANTO ANTÔNIO DO TAUÁ/PA). | 21 |
| FIGURA 7 - PRODUÇÃO DE INÓCULO | 22 |
| FIGURA 8 - FOTOBIOREATOR AIR LIFT DE PLACAS PLANAS. | 23 |
| FIGURA 9 - CULTIVO DE MICROALGAS EM FOTOBIOREACTORES <i>AIR LIFT</i> DE PLACAS PLANAS | 24 |
| FIGURA 10 - CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA40 | 28 |
| FIGURA 11 - PERCENTUAL DE VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DO ELE-POME AO LONGO CULTIVO COM A CEPA <i>C. BICONVEXA</i> EMBRAPA LBA40 | 31 |
| FIGURA 12 – AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS EM SUSPENSÃO | 33 |
| FIGURA 13 - CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA <i>TETRANEPHRIS SP.</i> EMBRAPA LBA52. | 35 |
| FIGURA 14 - PERCENTUAL DE VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DO ELE-POME APÓS O CULTIVO COM A CEPA <i>TETRANEPHRIS SP</i> EMBRAPA LBA52..... | 38 |
| FIGURA 15 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS EM SUSPENSÃO NO ELE-POME ANTES E APÓS O CULTIVO COM A CEPA <i>TETRANEPHRIS SP</i> EMBRAPA LBA52 | 40 |

1 INTRODUÇÃO

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. Países como Malásia e Indonésia são responsáveis por 85% da produção mundial, outros como Nigéria, Tailândia, Colômbia, Equador e Papua Nova Guiné correspondem a pouco mais de 6% do mercado mundial. O restante da produção se divide entre outros 36 países (ABRAPALMA, 2016)

O mercado de óleos vegetais mundial está em constante expansão, principalmente por se tratar de componentes presentes em muitos produtos alimentícios dos países mais populosos, como Índia e China, onde cerca de 80% da produção de óleo de palma é destinada à indústria de alimentos. Estima-se que em 2025 o consumo de óleo de palma ultrapasse 75 milhões de toneladas (LEVERMANN *et al.*, 2014). Contudo, para produção de uma tonelada deste óleo, são geradas 2,5 toneladas de POME (*Palm Oil Mill Effluent*), ou seja, em 2025 serão produzidas pouco menos de 190 milhões de toneladas de POME (AHMED *et al.*, 2015). O lançamento deste resíduo sem tratamento em cursos d'água é proibido. A destinação adequada segue as diretrizes da resolução CONAMA N° 430, DE 13 DE MAIO DE 2011 que define as condições e padrões de lançamento de efluentes industriais em cursos d'água.

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 consiste geralmente de um tratamento primário, onde 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 orgânica resultante (ADI e 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, hidrogênio e lipídeos. Além disso, durante o metabolismo, as células de microalgas assimilam nitrogênio e fósforo, característica interessante em 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. O desenvolvimento de uma metodologia de cultivo destes 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 das microalgas em águas residuais, além de aprimorar a produtividade deste bioprocessos (LEE e ZHANG, 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

Microalgas são microrganismos unicelulares capazes de utilizar a luz do sol, o CO₂ e a água como nutrientes para produção de biomassa. São encontradas em praticamente todos os ambientes marinhos, dulcícolas e solos úmidos. Estima-se que sejam responsáveis por 50% da atividade fotossintética global (CHIU *et al.*, 2015; MILANO *et al.*, 2016). Apresentam altas taxas de crescimento, sendo que a maioria das espécies pode dobrar a população celular dentro de 24h. Sob o ponto de vista de produção, as microalgas apresentam diversas vantagens como baixa exigência nutricional, possibilidade de cultivo em terrenos impróprios para a agricultura e capacidade de algumas cepas de crescimento em águas salinas ou salobras (DOGARIS *et al.*, 2015; DEMIRBAS, 2010; MATA *et al.*, 2010). Recentemente, têm-se mostrado que algumas espécies de microalgas são fontes potenciais de biocombustíveis (etanol, biodiesel) por apresentarem altas taxas de acúmulo de carboidratos e lipídeos, além de grande variedade de produtos para química fina, tais como corantes naturais, polímeros, ácidos orgânicos e antioxidantes (DOGARIS *et al.*, 2010).

A composição da biomassa algal depende de alguns fatores, dentre eles a cepa/espécie, as condições de cultivo e o metabolismo celular. Em função de sua atividade metabólica, as células algais podem acumular carboidratos, lipídios, proteínas e pigmentos (NURACHMAN *et al.*, 2015; SINGH e SHARMA, 2012). O alto teor de proteína de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para serem consideradas uma boa alternativa como fonte nutricional para a dieta humana e animal (Tabela 1). Com relação ao teor de lipídeos, pode-se observar o grande potencial que as microalgas possuem para serem utilizadas como fonte de óleo na produção de biocombustíveis (Figura 1) (ADI e NOGUCHI, 2015).

Tabela 1 - Comparação entre a composição geral de diferentes fontes alimentares para humanos e as microalgas.

| Matéria-prima | Proteína (%) | Carboidrato (%) | Lipídeo (%) |
|----------------------------|--------------|-----------------|-------------|
| <i>Saccharomyces spp.</i> | 36,40 | 44,80 | 3,20 |
| Carne | 43 | 1 | 34 |
| Leite | 26 | 38 | 28 |
| Arroz | 8 | 77 | 2 |
| Soja | 37 | 30 | 20 |
| <i>Anabaena cylindrica</i> | 43-56 | 25-30 | 4-7 |
| <i>C. reinhardtii</i> | 48 | 17 | 21 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51-58 | 12-17 | 14-22 |
| <i>Dunaliella salina</i> | 57 | 32 | 6 |
| <i>P. cruentum</i> | 28-39 | 40-57 | 9-14 |
| <i>S. obliquus</i> | 50-56 | 10-17 | 12-14 |
| <i>Spirulina máxima</i> | 60-71 | 13-16 | 6-7 |
| <i>Synechococcus sp.</i> | 63 | 15 | 11 |

Fonte: (SPOLAORE et al., 2006; PINTO et al., 2013)

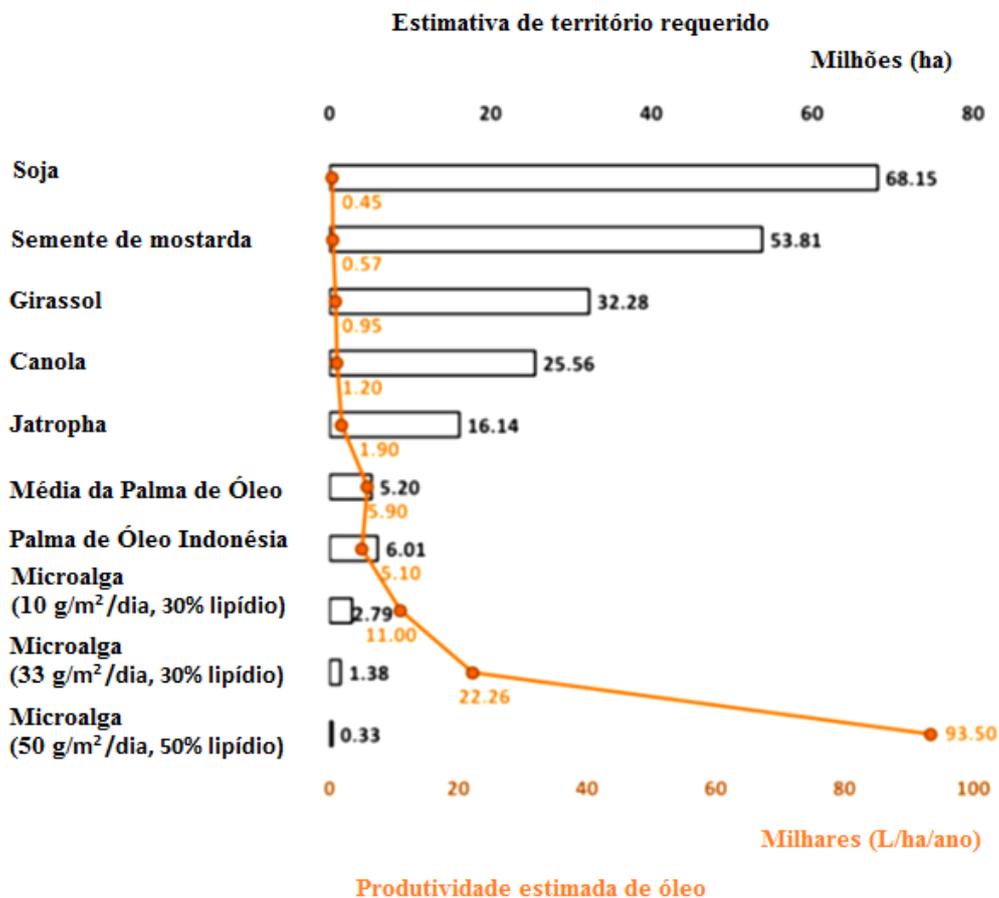


Figura 1 - Comparação da produtividade de óleo vs território requerido para produção, entre as fontes oleaginosas tradicionais e as microalgas. Fonte: (ADI e NOGUCHI, 2015)

2.2 FORMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

As microalgas podem se utilizar de três modos metabólicos distintos: i) fotoautotrófico, no qual a fonte de carbono do meio é o CO₂ e a alga realiza a fotossíntese pela disponibilidade de luz natural ou artificial; ii) heterotrófico, em que são oferecidas fontes de carbono orgânicas (Ex: glicose); ou iii) mixotrófico, no qual se utiliza um sistema misto entre o autotrófico e o heterotrófico, promovendo a adição tanto de carbono orgânico quanto inorgânico ao meio (KUNJAPUR e ELDRIDGE, 2010).

Conforme apresentado na Tabela 2, as fontes de energia e carbono disponíveis no meio de cultivo, bem como a cepa/espécie de microalga, influenciam nas vias metabólicas adotadas pela célula durante o crescimento.

Tabela 2 - Quadro comparativo entre o metabolismo algal autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

| Tipo de cultivo | Fonte de energia | Fonte de carbono | Metabolismo |
|----------------------|------------------|-----------------------|---|
| Autotrófico | Luz | Inorgânico | $H_2O + HCO_3^- \rightarrow C(\text{biomassa}) + 1/2O_2 + 3OH^-$ Observa-se aumento de pH. |
| Heterotrófico | Orgânica | Orgânica | $(1+a)CH_2O + O_2 \rightarrow C(\text{biomassa}) + aCO_2 + (1+a)H_2O$ Observa-se diminuição do pH. |
| Mixotrófico | Luz e Orgânica | Inorgânica e orgânica | $bHCO_3^- + cCH_2O \rightarrow (b+(c-a))C(\text{biomassa}) + 3OH^- + aCO_2$ |

Fonte: (KIM et al., 2013)

Os tipos de sistemas de cultivo de microalgas são divididos em fotobiorreatores abertos (ex: lagoa abertas e tanques tipo *raceway*), fotobiorreatores fechados (ex: fotobiorreatores em placas planas, tubulares, colunas, etc) e fermentadores, no caso de cultivos heterotróficos (MILANO *et al.*, 2016). Através destes equipamentos é possível oferecer as condições apropriadas para o crescimento contínuo das células, como temperatura, iluminação e nutrientes (SUN *et al.*, 2016).

Nas lagoas abertas a disponibilidade de radiação solar é elevada e o consumo de energia é baixo. Além disso, os custos de instalação e operação são mais baixos que o de sistemas fechados. Porém, apresentam alta vulnerabilidade à contaminação e controle limitado das condições de cultura. A lagoa *raceway*, tipo mais comum de fotobiorreator aberto, consiste em um canal oval onde há fluxo unidirecional do meio de cultivo agitado

mecanicamente por pás rotativas (Figura 2A). A profundidade da lagoa é de aproximadamente 30 a 40 cm e há o contato direto com o ar atmosférico.

Já nos fotobiorreatores fechados a cultura não encontra-se exposta ao ambiente, há menor susceptibilidade à contaminação e o sistema apresenta maiores possibilidades de controle das condições de cultivo (SLADE; BAUEN, 2013). Estes são constituídos de material translúcido para permitir a penetração dos raios luminosos e são mais recomendados para processos em que o produto possua maior valor agregado, devido ao seu alto custo de implantação e manutenção (maior consumo de energia e maior custo dos equipamentos) (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

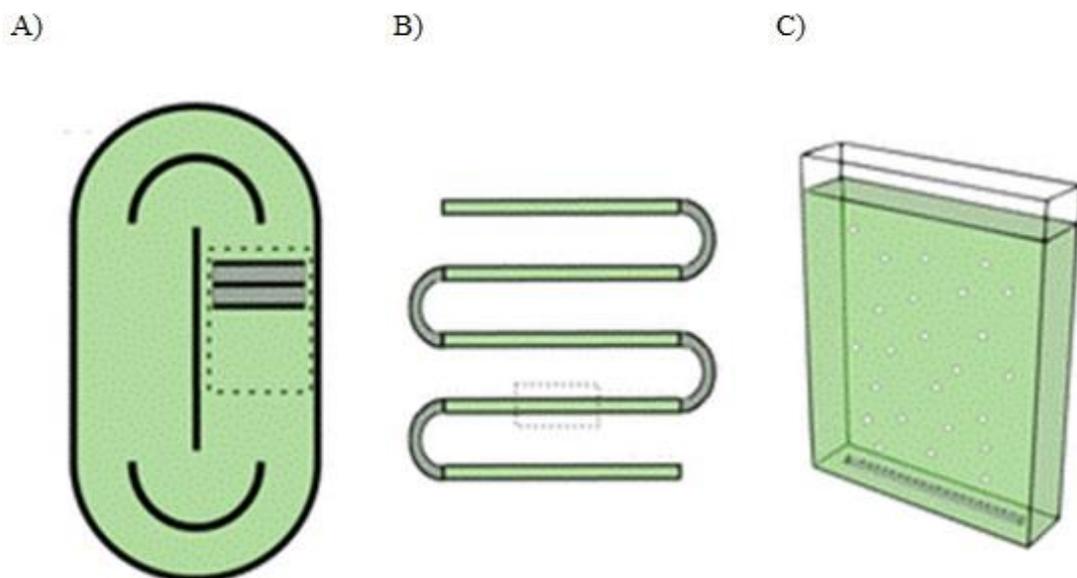


Figura 2 - Tipos de fotobiorreatores: A) lagoa aberta (*raceway*); B) fotobiorreator fechado (tubular) (C) fotobiorreator fechado (placas planas).

(Fonte: <http://d10k7sivr61qqr.cloudfront.net/content/royinterface/10/81/20121041/F1.medium.gif>)

Os principais tipos de fotobiorreatores fechados são aqueles em geometria tubular (Figura 2B) e em placas planas (*flat plate*) (Figura 2C). Os fotobiorreatores tubulares podem ser dispostos horizontalmente, inclinados, verticalmente ou em espiral, além disso, podem apresentar tubos de distribuição conectando os sistemas tubulares ou serpentinados (AZEREDO, 2012). Já os reatores em placas planas consistem em superfícies transparentes colocadas a uma curta distância entre si, para facilitar a penetração da luz, entre as quais circula o meio de cultura (MIGUEL, 2011). Na maioria das vezes, este modelo é escolhido por apresentar menor custo de instalação em relação aos demais sistemas fechados, alto índice

de absorção luminosa e de produção de biomassa devido à boa taxa de aproveitamento área/volume (YANG *et al.*, 2014).

2.3 APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS MICROAGAS

2.3.1 Indústria de alimentos

A grande diversidade do grupo de microalgas e, principalmente a versatilidade de algumas espécies, confere a estes microrganismos inserção em inúmeras aplicações comerciais como alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis, biofixação de CO₂ e biorremediação de efluentes urbanos e industriais.

O uso de microalgas para alimentação humana se dá há décadas, sendo os gêneros *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella* os mais difundidos por serem ricos em proteínas e vitaminas. A apresentação dos produtos geralmente é em forma de tabletes, pastilhas, cápsulas ou em pó (PULZ e GROSS, 2004). Durante a década de 70 e 80, a Ásia iniciou os primeiros projetos com cultivos de microalgas para alimentação animal, produzindo mais de 1000 kg de biomassa (principalmente *Chlorella*) por mês. Paralelamente, na Austrália teve início a produção de β-caroteno a partir da microalga *Dunaliella salina*. Com o sucesso da produção, plantas industriais também foram instaladas em Israel e nos Estados Unidos. Algumas indústrias investiram também na produção de astaxantina através do cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* nos EUA e Índia (SPOLAORE *et al.*, 2006).

2.3.2 Biocombustíveis

A alta produtividade de óleo e o baixo requerimento por terra, aliado à capacidade de se desenvolver utilizando resíduos (águas residuárias, CO₂) e terras não agricultáveis têm candidatado as microalgas como fonte promissora para a terceira geração de biocombustíveis. Dentre os diversos tipos de energia, se destacam trabalhos com biodiesel (TALEB *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016), metano (ALZATE *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2014), hidrogênio (REN *et al.*, 2015) e etanol (HO *et al.*, 2013).

2.3.3 Sequestro de carbono

Segundo Rezvani e colaboradores (2016) o cultivo de microalgas em larga escala para biosequestro de CO₂ em usinas pode ser um processo alternativo as tecnologias convencionais de tratamento de gases. No entanto, para que o processo em larga escala seja viável é preciso criar receitas adicionais através da venda da biomassa gerada.

A compreensão e otimização do processo de crescimento das microalgas é um pré-requisito essencial para a captura eficaz de CO₂ em fotobiorreatores. Mortezaeikia e colaboradores (2016) testaram o impacto causado pela concentração CO₂ no cultivo de *Synechococcus elongatus* em dois modelos diferentes de fotobiorreatores nos quais as concentrações de 5 e 10% foram as que obtiveram melhores resultados com relação as taxas de crescimento máximo das células. Qi e colaboradores (2016) desenvolveram uma variedade mutante *Chlorella vulgaris* capaz de biofixar CO₂ de gases de escape industrial, a cepa apresentou tolerância a altas concentrações de CO₂ e acúmulo de mais de 40% de carboidrato total.

2.3.4 Tratamento biológico de efluentes

A aplicação de microalgas no tratamento de águas residuárias é feita desde 1950, em um processo no qual as células removem principalmente nitrogênio e fósforo de efluentes que seriam lançados no meio ambiente (KAMYAB *et al.*, 2015). Nestes sistemas de tratamento as microalgas fornecem o oxigênio necessário para bactérias aeróbias degradarem certos constituintes de águas residuais, o que reduz a carga poluidora da água e, concomitantemente, há produção de biomassa que pode ser valorizada sob a forma de biocombustíveis ou de bioprodutos (SOLIMENO *et al.*, 2015). O tratamento não só de esgotos domésticos, como também de águas residuais provenientes de agroindústrias, por meio do cultivo de microalgas têm demonstrado reduções significativas nas cargas poluidoras. Assim, é possível diversificar os processos das estações de tratamento, gerando também biomassa rica em moléculas de valor comercial (KAMARUDIN *et al.*, 2015). Ji e colaboradores (2013) demonstraram o potencial de três espécies de microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Ourococcus multisporus*) para a produção de biocombustíveis associado ao tratamento de águas residuais e suplementação de 15% de CO₂. As cepas obtiveram taxas de crescimento específico de 1,37/dia, 1,14/dia e 1,00/dia, respectivamente, e a remoção praticamente completa (> 99%) de nitrogênio e fósforo após 4 dias de cultivo.

2.4 PRODUÇÃO DE PALMA DE ÓLEO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) é uma planta monocotiledônea pertencente à família *Arecaceae*, subfamília *Arecoideae*, tribo *Cocoseae* e subtribo *Elaeidinae*, oleaginosa de origem africana e tem como característica a alta produção de óleo. Estima-se que para a mesma produção de óleo de uma lavoura de soja, são necessários apenas 10% da área plantada com palma de óleo (LEVERMANN *et al.*, 2014, BORGES *et al.*, 2016). Calcula-se que a palma de óleo seja responsável por um terço do mercado de óleos vegetais. A produtividade desta planta equivale a 4 toneladas por hectare/ano (ABRAPALMA, 2016)

A partir dos frutos da palma são extraídos dois tipos de óleo, o óleo de palma proveniente do mesocarpo e o óleo de palmiste, que é encontrado nas amêndoas. As aplicações variam desde ceras, loções e óleos corporais a óleo de cozinha, margarina, produtos de limpeza e substituto do óleo diesel (LEVERMANN *et al.*, 2014). Um esquema básico do processo de extração do óleo de palma é apresentado na Figura 3.

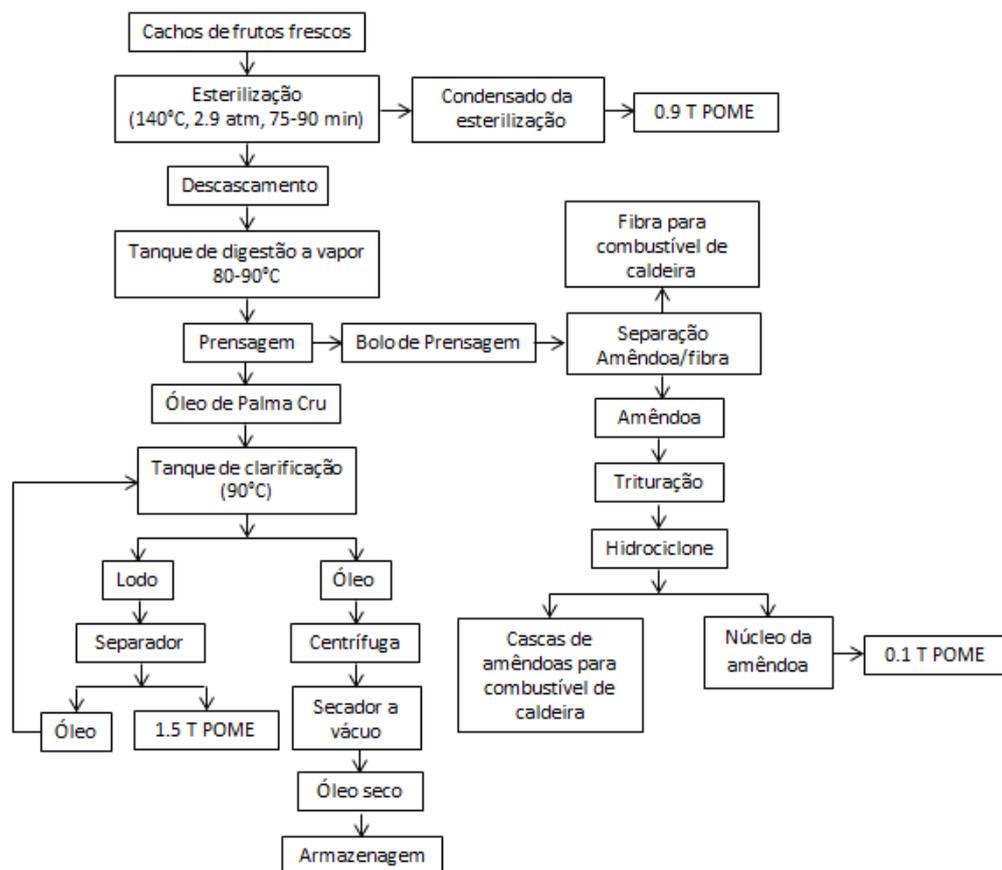


Figura 3 - Fluxograma do processo de extração do óleo de palma. (Fonte: AHMED *et al.*, 2015)

2.5 O EFLUENTE DA Prensagem do Fruto da Palma de Óleo (Palm Oil Mill Effluent – POME)

O Palm Oil Mill Effluent (POME) é um resíduo líquido, de cor acastanhada, pH entre 4-5, odor forte, gerado durante o processo de extração do óleo de palma. Contém 95-96% de água, grandes quantidades de sólidos totais ($40.500\text{--}72.058\text{ mg L}^{-1}$), óleo/graxa ($4.000\text{--}9.341\text{ mg L}^{-1}$) e altas concentrações de DBO ($25.000\text{--}65.714\text{ mg L}^{-1}$) e DQO ($44.300\text{--}10.2696\text{ mg L}^{-1}$). Apresenta uma quantidade importante de aminoácidos, nutrientes inorgânicos (Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Co e Cd), fibras, compostos nitrogenados, ácidos orgânicos livres e hidratos de carbono, lignina (4700ppm), compostos fenólicos (5800 ppm), pectina (3400 ppm) e caroteno (8 ppm) (CHIN *et al.*, 2013; AHMED *et al.*, 2015).

Por se tratar de um efluente altamente poluente, o POME não pode ser descartado sem tratamento. A forma mais comum de disposição do efluente é o sistema de lagoas de estabilização (Figura 4).



Figura 4 - Lagoas de estabilização de POME em agroindústria de palma-de-óleo em Papua Nova Guiné. A imagem ilustra como é disposto o sistema de lagoas de estabilização, no qual o processo inicia-se a partir da entrada do efluente na lagoa anaeróbia, passa para a lagoa aeróbia e por fim chega à lagoa de maturação. (Fonte: <http://www.myclimate.org/carbon-offset-projects/projekt/papua-neuguinea-biogas-7141/>)

Lagoas de estabilização são os sistemas de tratamento de águas residuais mais comuns usados em diferentes zonas climáticas. Condições ambientais, tais como altas temperaturas e radiação solar ao longo do ano são as principais razões para seu uso extensivo em países tropicais. Consistem em corpos d'água em série, normalmente constituídos de três lagoas sequenciais: anaeróbia, aeróbia e de maturação. Em alguns casos adiciona-se outra lagoa entre a anaeróbia e a aeróbia, a chamada lagoa facultativa, que é uma lagoa intermediária entre as duas anteriores (NERY *et al.*, 2013; GLAZ *et al.*, 2016).

Dentre as vantagens das lagoas de estabilização, pode-se citar o excelente desempenho quanto à remoção de matéria orgânica e sólida, o baixo custo de implantação e manutenção e a capacidade de trabalhar com sobrecargas hidráulicas e orgânicas. A limitação na implantação de sistemas de lagoas constitui-se na necessidade do uso de grandes áreas (SOUSA *et al.*, 2014)

As lagoas anaeróbias comumente possuem de 2 a 5m de profundidade e recebem águas residuais com níveis elevados de carga orgânica (normalmente maior do que 100 g de DBO m⁻³ dia⁻¹, equivalente a mais de 3000 kg ha⁻¹dia⁻¹ para uma profundidade de 3m). Não há presença de oxigênio dissolvido (OD) ou algas. A remoção da DBO é feita por sedimentação de sólidos, e subsequente digestão anaeróbia do lodo que se forma no fundo do tanque (AL-HASHIMI *et al.*, 2013). No processo de estabilização do efluente há a formação de gás metano, enxofre e dióxido de carbono, liberando alguns subprodutos solúveis na coluna de água (ex: ácidos orgânicos e amônia) (PHUNTSHO *et al.*, 2009).

As lagoas aeróbias são mais rasas para que a luz solar possa penetrar por toda a coluna de água e favoreça o desenvolvimento de algas. Nesta fase a água possui teor mais baixo de sólidos e menor DBO (GLAZ *et al.*, 2016). Para o sistema de lagoas aeróbias existem dois modelos, as lagoas rasas (com aeração natural) e lagoas aeradas (com aeração mecânica). O segundo modelo possibilita maiores profundidades, no entanto há gasto de energia com o sistema de aeração (AL-HASHIMI *et al.*, 2013).

As lagoas de maturação são o último estágio do tratamento. Este tipo de lagoa é destinado à remoção de patógenos, nitrogênio (N) e fosforo (P) que não foram eliminadas nos processos anteriores. A carga de resíduo que é despejada nesta lagoa já possui DBO praticamente estabilizada e o oxigênio está dissolvido em todo o material (GLAZ *et al.*, 2016)

2.6 MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE POME

O descarte adequado de efluentes no País é gerenciado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Através de resoluções, o CONAMA define quais as condições e padrões de qualidade devem ser obedecidos nos sistemas de tratamento de efluentes. De acordo com os art.3º e art.12º da resolução CONAMA nº 430, de 13 de Maio de 2011:

Art. 3º - Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente nos corpos receptores após o devido tratamento e desde que obedecem às condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução e em outras normas aplicáveis.

Art. 12º - O lançamento de efluentes em corpos de água, com exceção daqueles enquadrados na classe especial, não poderá exceder as condições e padrões de qualidade de água estabelecidos para as respectivas classes, nas condições da vazão de referência ou volume disponível, além de atender outras exigências aplicáveis.

Sendo o efluente da extração do óleo de palma altamente poluidor e produzido em grandes quantidades, a destinação deste passivo ambiental constitui importante problema para as indústrias do setor. O cultivo de microalgas em efluentes torna-se atrativo para os sistemas de tratamentos de águas residuais, devido à associação do biotratamento à produção simultânea de biomassa com valor agregado e com inúmeras aplicações (ABDEL-RAOUF, 2012). A utilização do POME como meio para cultivo de microalgas é uma alternativa interessante por ser um material de baixo custo e conter quantidade razoáveis de nitrato, fosfato, Fe, Zn, P, Mg, Ca e K que são necessários para o desenvolvimento de microalgas (NWUCHE *et al.*, 2014; LAM e LEE, 2011). Alguns trabalhos demonstram a eficiência das microalgas no tratamento do POME, com remoção de fósforo total de até 63% e nitrogênio total de 73% (DING *et al.*, 2016) e 67% de redução da DQO (KAMYAB *et al.*, 2015). No entanto, por se tratar de um efluente agroindustrial, a sua composição pode variar drasticamente de um lote para outro, o que implica na variação da eficiência do processo de tratamento, devido a sensibilidade de um bioprocessamento a mudanças na composição dos meios de cultivo (NWUCHE *et al.*, 2014).

Cereijo (2016) selecionou, a partir da triagem de 23 cepas da coleção de microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa, duas cepas de microalgas que apresentaram altas taxas de crescimento em efluente de lagoa anaeróbia de estabilização do POME (ELE-POME), em escala de bancada. Uma delas é a cepa *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40, isolada a partir de áreas de aplicação de

vinhaça da usina Jalles Machado (Goianésia/GO). Esta cepa, que possui alto teor de proteínas (SANTANA, 2016), também apresentou alta produtividade em meio de cultivo a base de vinhaça, o principal efluente de usinas sucroalcooleiras. A segunda microalga selecionada foi a cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 isolada da lagoa aeróbia de estabilização de POME da agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá/PA). Esta espécie da família Selenastraceae, caracteriza-se pelo formato em meia lua e por produzir alto teor de lipídios.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a capacidade das microalgas *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 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. Os objetivos específicos são avaliar a variação de carga orgânica e inorgânica (NPK) do ELE-POME após o cultivo algal; avaliar a remoção de sólidos em suspensão por meio da colheita da biomassa algal por centrifugação; estabelecer o tempo ótimo de cultivo visando à maximização da produtividade de biomassa algal e a biorremediação do ELE-POME e agregar sustentabilidade ambiental e econômica ao processo de tratamento do ELE-POME.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICROALGAS

As cepas de *Chlamydomonas biconvexa* (Figuras 5A, 5B) e *Tetranephris sp.* (Figuras 5C e 5D) utilizadas neste trabalho pertencem à coleção de microrganismos fotossintetizantes da Embrapa Agroenergia, nomeadas como Embrapa|LBA40 e Embrapa|LBA52, respectivamente. Estas cepas foram previamente selecionadas quanto à capacidade de crescimento em efluente de lagoa anaeróbia de estabilização de POME por Cereijo (2016).

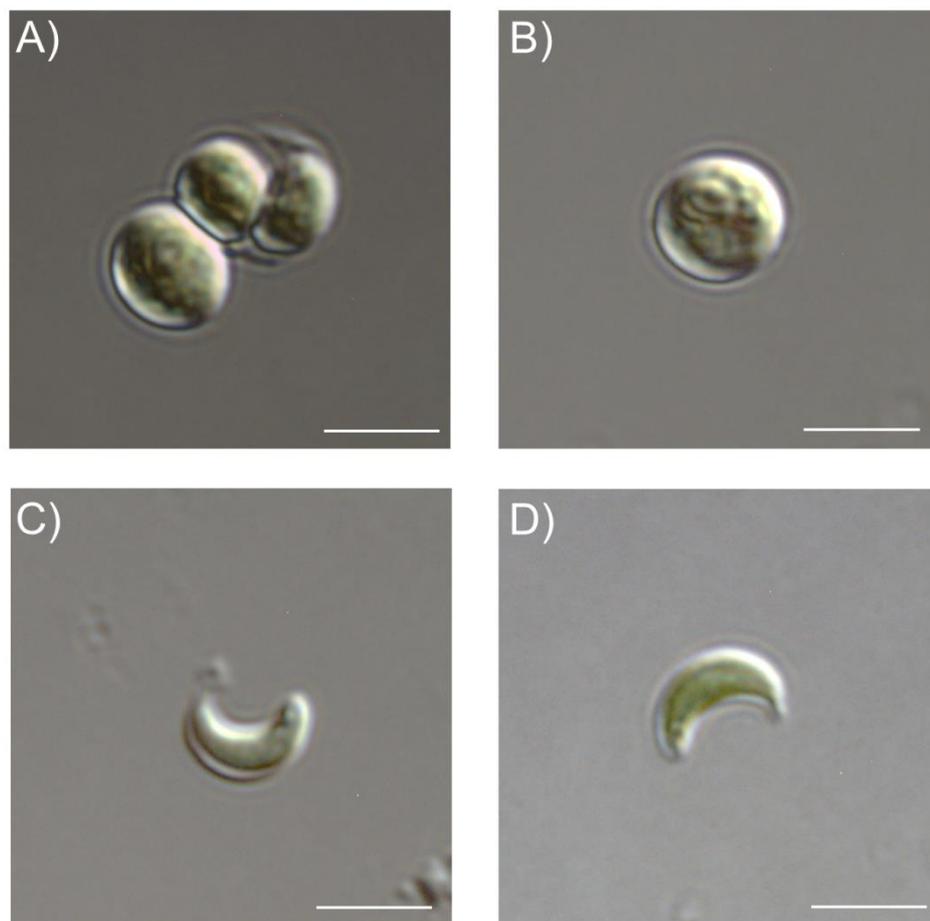


Figura 5 - *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA40 (A e B) e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 (C e D). Fotomicrografias obtidas por meio de microscopia de luz utilizando técnica DIC (contraste diferencial de fase). Escala: 5 µm. Fonte: Catálogo da coleção de microalgas aplicadas à agroenergia e biorrefinarias da Embrapa.

3.2 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados neste trabalho dois tipos de meio de cultivo: i) Bold's Basal Medium (BBM) (NICHOLS et al., 1965) modificado por Brunale (2014); ii) Efluente da Lagoa anaeróbia de Estabilização do POME (ELE-POME) coletado na agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá/PA) (Figura 6).



Figura 6 – Lagoas de estabilização de POME na agroindústria Denpasa (Santo Antônio do Tauá/PA). A seta branca indica o ponto de coleta do ELE-POME na saída da lagoa anaeróbia de estabilização de POME. Fonte: Bruno Brasil (acervo pessoal).

Antes do cultivo, o ELE-POME foi submetido a um pré-tratamento que consistiu na redução dos sólidos suspensos com o objetivo de eliminar possíveis interferências nas medidas de peso seco e esterilização para estocagem. Esta etapa foi realizada por meio de centrifugação por 5 minutos a $16.267 \times g$ seguido de autoclavagem por 30 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ atm}$. Posteriormente, o ELE-POME foi estocado a temperatura ambiente até o início do cultivo.

3.3 PRODUÇÃO DE INÓCULO ALGAL

Os inóculos algais foram produzidos em condições estéreis, utilizando frascos erlenmeyers de 1 litro contendo 500ml de meio BBM em condições estéreis, com iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12/12 claro/escuro, temperatura de 28°C , aeração de 10Lh^{-1} . Após 7 dias de cultivo (fim da fase exponencial) o conteúdo dos erlenmeyers foi homogeneizado em um frasco único e inoculado em quantidade suficiente para garantir a

densidade óptica inicial de 0,1 nos fotobiorreatores de placas planas. A quantidade de inóculo utilizada foi sempre menor 10% do volume de trabalho nos fotobiorreatores. .



Figura 7 - Produção de inóculo em frascos Erlenmeyer de 1L sob iluminação artificial de 16.000 Lux, ciclo de iluminação 12/12 claro/escuro, temperatura de 28°C, aeração de 10Lh⁻¹.

3.4 CULTIVO EM FOTOBIORREACTORES *AIR LIFT* DE PLACAS PLANAS

Os ensaios foram realizados utilizando fotobiorreatores *air lift* de placas planas de acrílico de 15L de capacidade, com suplementação de dióxido de carbono (Figura 8). O equipamento conta com sistema de aeração por ar atmosférico injetado com o auxílio de compressores de ar (Big Air/A420), sendo a distribuição do ar dentro do biorreator feita por uma mangueira com furos em série e a vazão controlada por rotômetros (Dwyer/RMA-150-SSV/Range: 100-1000 cm³ min⁻¹). A suplementação com CO₂ foi realizada por um sistema composto por mangueiras de silicone e válvulas de distribuição, também controlada por rotômetros, com o gás proveniente de um cilindro de 25 kg. A iluminação dos reatores é proveniente de refletores com lâmpadas de vapor metálico (Spotlux 400w/OSRAM) e a intensidade luminosa foi medida por um luxímetro (Instrutherm/LD-200). Para o controle do aquecimento do meio de cultivo foram utilizados termostatos (Atman/At-25/ Range: 20-34 °C) e termômetro digital (Incoterm/COD02.0.00.7427). A sala onde ocorreram os experimentos manteve-se climatizada (20° C) para controlar o aquecimento do meio provocado pelos refletores.

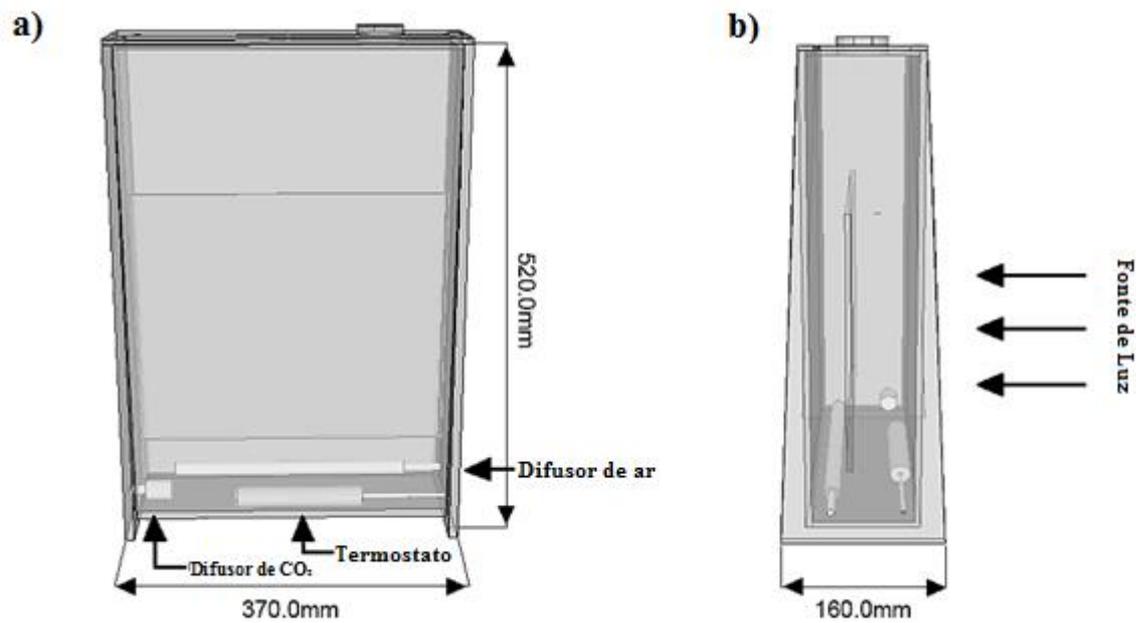


Figura 8 - Fotobiorreator *air lift* de placas planas em acrílico de 15L de capacidade com suplementação de dióxido de carbono. O fotobiorreator conta com sistema agitação *air lift* promovida por ar atmosférico distribuído por uma mangueira com furos em série. O controle de temperatura é realizado por termostato e injeção de CO₂ é feita por meio de um difusor posicionado em sentido contracorrente da agitação do reator. A iluminação é realizada unilateralmente por meio de refletores com lâmpadas de vapor metálico.

As cepas *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA 52 foram cultivadas 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 60Lh⁻¹ e suplementação de CO₂ ajustada para 5% da vazão de ar (Figura 8). As cepas foram cultivadas em bateladas independentes durante 5, 10 e 15 dias, utilizando 13L ELE-POME ou meio BBM (meio sintético controle). 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.



Figura 9 - Cultivo de microalgas em fotobiorreatores *air lift* de placas planas em acrílico. Os cultivos foram realizados sob 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 60L/h e suplementação de CO₂ ajustada em para 5% da vazão de ar.

3.5 COLHEITA DA BIOMASSA ALGAL

A separação entre o meio de cultura e as células algais foi feita por meio de centrifugação durante 5 minutos a 16.267 x g. O sobrenadante foi autoclavado por 15 minutos e armazenado em bombonas para as análises da composição química. A biomassa retirada dos fotobiorreatores foi congelada a -80°C por 24h e posteriormente liofilizada (Liofilizador LIOTOP K105).

3.6 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, contagem de células e densidade óptica.

Para a determinação do peso seco, 3 amostras de 10 ml foram centrifugadas por 10 minutos à $10.732 \times g$ e lavadas com 10 ml de água destilada (3x), e então resuspendidas em água destilada. Paralelamente, placas de petri foram lavadas, secas em estufa a 105°C por uma hora e após arrefecimento de 20 minutos foram pesadas. A partir da pesagem das placas, a biomassa lavada foi adicionada às placas e então postas em estufa por 24 horas a 105°C . Ao final do período de secagem, as placas foram novamente resfriadas em dessecador por 20 minutos e pesadas. A diferença entre a massa da placa com biomassa seca e da placa vazia foi definida como o peso seco da amostra.

Para a medida de número de células, foram utilizadas 3 alíquotas de 0,5 ml do cultivo, às quais foram adicionadas 0,5 ml de solução Transeau para fixação da amostra. A solução Transeau contém água destilada:etanol 96%:formol 40% na proporção de 6:3:1 e funciona como conservante e redutor de mobilidade das células o que facilita a contagem, realizada em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer (hematocitômetro).

A leitura em espectrofotômetro (SPECTRAMAX M3, Molecular Devices) foi utilizada para determinação da densidade óptica seguindo a Lei de Lambert-Beer, que diz que a densidade óptica do material é proporcional à quantidade de matéria absorvente. As leituras foram realizadas em 3 alíquotas dos cultivos em comprimento de onda de 680 nm .

3.7 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. Estas análises foram realizadas pela empresa AMBIENTALE, em Maringá/PR, através das metodologias apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Metodologias utilizadas para a determinação dos parâmetros químicos do ELE-POME, antes e após o cultivo das microalgas.

| Parâmetro | Método |
|------------------------|---------------------------|
| DBO | SM 5210 B |
| DQO | QAM.IT.FQ.16 ^a |
| Carbono Orgânico Total | SM 4500-O/D |
| Nitrogênio Total | ABNT NBR 13796:1997 |
| Nitrato | ABNT NBR 12620:1992 |
| Nitrito | SM 4500-NO2-B |
| Nitrogênio Amoniacal | SM 4500-NH3 F |
| Fósforo Total | SM 4500-P E |
| Fosfato | SM 4500-P E |
| Potássio | SM 3500-K B |
| pH | SM 4500-H+ B |
| Turbidez | SM 2130 B |

Segundo a resolução CONAMA N° 430, DE 13 DE MAIO DE 2011, as condições do efluente pós-tratamento são diretamente influenciadas pelo tipo de corpo receptor. A classificação dos corpos d'água é feita no texto da resolução CONAMA N° 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Para efeito de comparação entre os resultados obtidos nos cultivos das duas cepas, utilizou-se como referência os padrões de qualidade de corpo receptor de água doce classe I.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada análise da variância (ANOVA) de fator único com repetição, e foi usado o teste de Tukey, a 5% de significância, para comparação entre as médias. Para esta avaliação estatística, utilizou-se o programa SISVAR.

4 RESULTADOS

4.1 CULTIVO DA CEPA *Chlamydomonas biconvexa* EMBRAPA|LBA 40 EM FOTOBIOREATORES DE PLACAS PLANAS

A cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 foi cultivada em fotobiorreatores *air lift* com geometria em placas planas em bateladas independentes por 5, 10 e 15 dias utilizando 13L de Efluente da Lagoa de Estabilização do POME (ELE-POME) ou meio BBM (controle) suplementados com CO₂. A figura 10 apresenta os gráficos de crescimento desta cepa baseado na média das 3 bateladas. A medição do crescimento algal por densidade óptica (Figura 10A), número de células (Figura 10B) e rendimento de biomassa (peso seco) (Figura 10C) gerou gráficos de crescimento com padrões similares e não foi observada diferença significativa no crescimento algal entre o meio BBM e o ELE-POME. Pelos gráficos é possível dizer que a cepa esteve em fase exponencial de crescimento até o 10º dia de experimento.

A densidade óptica máxima da cultura em BBM chegou a $1,23 \pm 0,01$ e em ELE-POME $1,27 \pm 0,01$. A figura 10B traz a interpolação do número de células/ml de meio, no qual a cultura em BBM obteve maior resultado no 5º dia, tendo alcançado pouco mais de $49 \pm 5,06 \times 10^6$ de cel mL⁻¹, já o resultado em ELE-POME foi maior no 10º dia com $25 \pm 1,50 \times 10^6$ de cel mL⁻¹. O gráfico 10C apresenta o rendimento da biomassa máximo de $1.473,33 \pm 75,06$ mgL⁻¹ em BBM e de $1.560,00$ mgL⁻¹ em ELE-POME, ambos no 10º dia de cultivo.

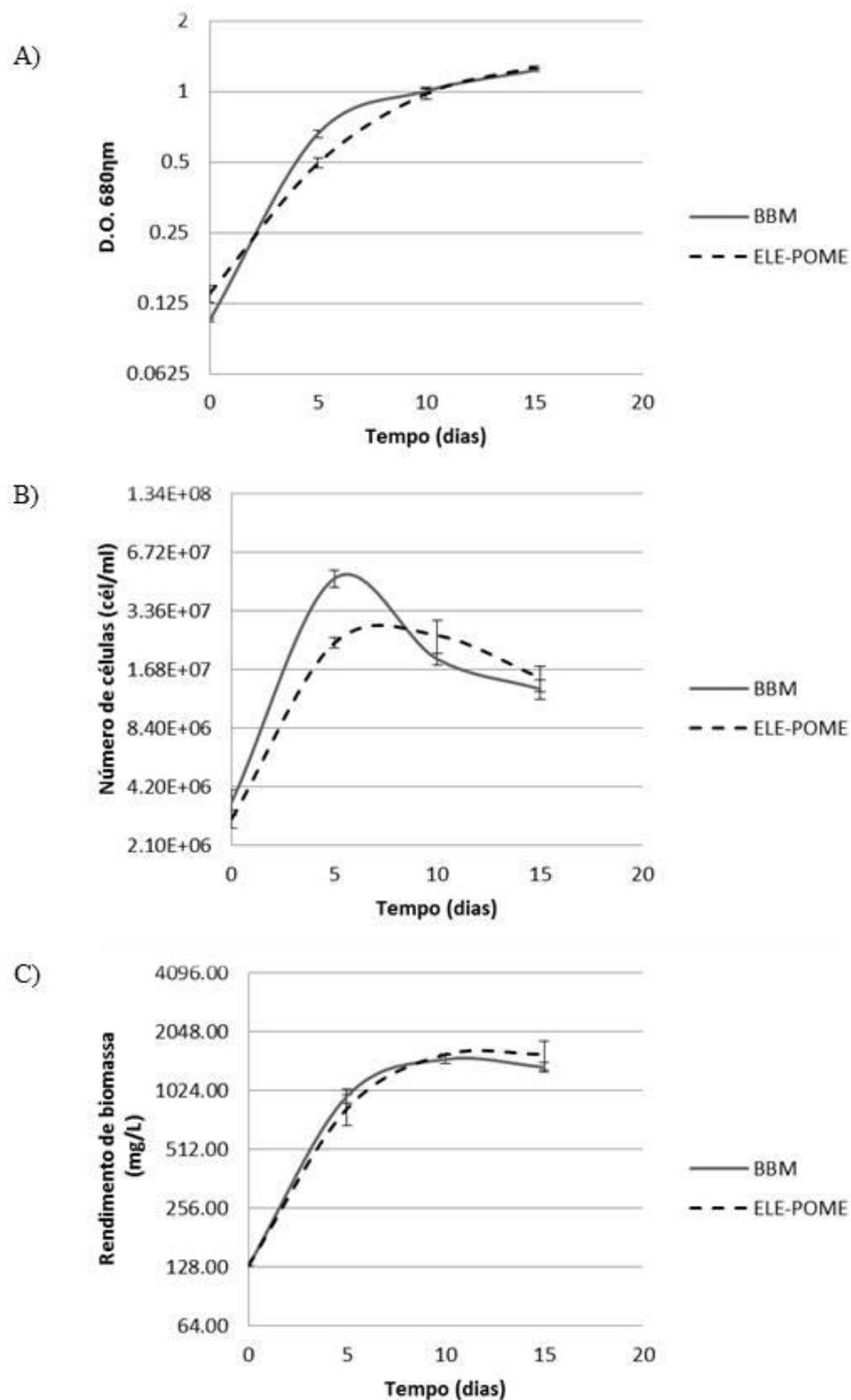


Figura 10 - Curva de crescimento da cepa *C. biconvexa* Embrapa/LBA 40 cultivada em fotobiorreatores *air lift* de placas planas: (A) densidade óptica (680 nm), (B) número de células (cel ml^{-1}) e (C) rendimento de biomassa (mg L^{-1}) por 5, 10 e 15 dias utilizando meio BBM e ELE- POME. A aeração foi feita por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO_2 em regime de iluminação de 12h/12h do ciclo claro/escuro e temperatura de $35\pm 1^\circ\text{C}$ durante a iluminação e $25\pm 1^\circ\text{C}$ durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas ($n = 3$).

Os dados de produtividade da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 são apresentados na Tabela 4. As análises estatísticas demonstraram que no cultivo em BBM há diferença significativa entre os tempos, sendo o 5º dia superior aos outros dois. Já no cultivo em ELE-POME, não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 5 e 10 dias. A comparação entre os meios para cada tempo de cultivo mostrou que não há diferença significativa na produtividade de biomassa entre o meio controle e o ELE-POME. É possível observar, pelas taxas específicas de crescimento, que os cultivos foram mais vigorosos no tempo de cultivo de 5 dias.

Tabela 4 - Produtividade de biomassa em mg/L/dia da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40

| Meio | Produtividade (mg/L/dia) | | | Taxa específica de crescimento (μ /dia) | | |
|-----------------|--------------------------|---------------------|---------------------|--|-----------------|-----------------|
| | 5 dias | 10 dias | 15 dias | 5 dias | 10 dias | 15 dias |
| BBM | 164,67 \pm 15,01aA | 134,34 \pm 7,50bA | 83,78 \pm 5,00cA | 0,40 \pm 0,02 | 0,24 \pm 0,01 | 0,16 \pm 0,00 |
| ELE-POME | 130,00 \pm 26,00abA | 143,00 \pm 0,00aA | 92,44 \pm 10,01bA | 0,32 \pm 0,07 | 0,25 \pm 0,00 | 0,05 \pm 0,00 |

Os resultados são apresentados como médias de triplicatas ($n = 3$). A análise estatística foi realizada com ANOVA de fator duplo com repetição, e foi usado o teste de Tukey para comparação entre as médias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de cultivo, para o mesmo meio. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os meios, para o mesmo tempo de cultivo.

4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE PÓS-CULTIVO DA CEPA *C. biconvexa* EMBRAPA|LBA 40

Os sobrenadantes pós-colheita dos cultivos em ELE-POME da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 realizados em fotobiorreatores por 5, 10 e 15 dias foram analisados quanto à DQO, DBO, Carbono orgânico total, nitrogênio, fósforo, potássio e pH. A tabela 5 mostra comparativamente os resultados de cada ensaio juntamente com os dados do efluente antes do tratamento. É possível notar redução de até 76,74%, 88,85%, 64,90%, 35% nas concentrações de nitrito, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e nitrato, respectivamente, após o crescimento das algas. No entanto, as concentrações de potássio não apresentaram variação significativa em nenhum dos tempos analisados. Também houve redução de fosfato e fósforo total. Variações no pH do meio foram mais significativas no 15º dia. Com relação à DQO, DBO e carbono orgânico total verificou-se aumento significativo com o tempo de cultivo.

Tabela 5 - Análise dos sobrenadantes pós-colheita da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40

| Ensaio | Condição Inicial (ELE-POME) | 5 dias | 10 dias | 15 dias |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| DBO (mg O ₂ /L) | 20,8±1,70 a | 38,70±0,57 b | 49,85±1,20 c | 133,95±1,63 d |
| DQO (mg O ₂ /L) | 667,00±7,07 a | 734,00±4,24 b | 768,00±11,31 b | 1272,00±28,28 c |
| Carbono Orgânico Total (mg/L) | 3680,70±243,39 a | 4678,40±778,38 ab | 4816,00±194,60 ab | 5916,60±194,31 b |
| Nitrogênio Total (mg/L) | 79,19±6,15 b | 30,43±0,33 a | 27,79±0,21 a | 37,41±0,47 a |
| Nitrato (mg/L) | 0,72±0,00 b | 0,71±0,01 b | 0,56±0,03 a | 0,47±0,04 a |
| Nitrito (mg/L) | 0,22±0,01 | ND* | ND* | ND* |
| Nitrogênio Amoniacal (mg/L) | 44,85±0,64 | ND** | ND** | ND** |
| Fósforo Total (mg/L) | 20,13±0,88 c | 1,03±0,08 a | 0,80±0,08 a | 4,55±0,07 b |
| Fosfato (mg/L) | 56,75±2,47 c | 1,18±0,01 a | 1,55±0,06 a | 14,30±0,71 b |
| Potássio (mg/L) | 1850,00±70,71 a | 1575,00±106,10 a | 1750,00±70,71 a | 1875,00±35,36 a |
| pH | 9,17±0,01 d | 8,37±0,02 b | 8,52±0,07 c | 8,01±0,01 a |

Análise da composição do ELE-POME antes e após o cultivo com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores air lift de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). 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). ND* = não detectado (concentração < 0,05); ND** = não detectado (concentração < 5,00);

A Figura 11 apresenta as taxas de remoção da carga orgânica (A) e inorgânica (N, P e K) (B), dos cultivos por 5, 10 e 15 dias da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. 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 (10^o dia de cultivo). Por outro lado, as concentrações de N e P apresentam reduções significativas, de 60% e 90% respectivamente, que se mantêm praticamente estáveis desde o 5^o dia de cultivo. A concentração do potássio não variou significativamente ao longo do tempo de cultivo. A comparação das Figuras 10 e 11 evidencia que à medida que as células algais entram em fase estacionária de crescimento, há aumento concomitante da carga orgânica do meio.

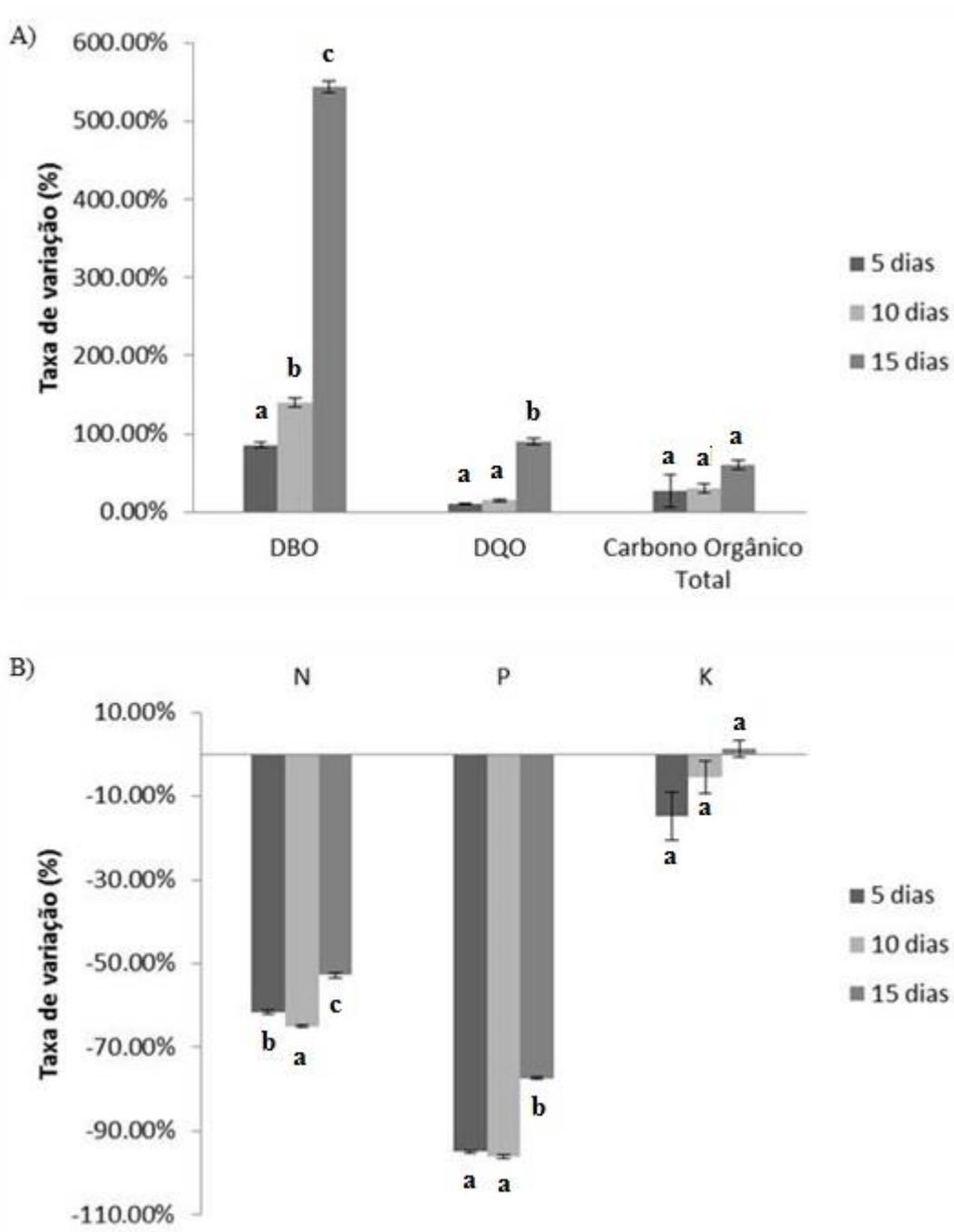


Figura 11 - Percentual de variação na composição do ELE-POME ao longo cultivo com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). 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).

4.3 AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS DO ELE-POME APÓS O CULTIVO E COLHEITA DA BIOMASSA DA CEPA *C. biconvexa* EMBRAPA|LBA 40

Foi analisada a eficiência de remoção de sólidos suspensos dos sobrenadantes pós-colheita dos cultivos em ELE-POME da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 realizados em fotobiorreatores por 5, 10 e 15 dias por meio de medidas de densidade óptica a 680 nm (Figura 12A) e turbidez (Figura 12B). Uma redução na densidade óptica de até 65,56% e de turbidez de 95,42%, foi observada após cultivo de 5 dias. Os resultados indicam que a remoção de sólidos suspensos foi maior nos tempos iniciais de cultivo (5 e 10 dias de cultivo), sugerindo que a eficiência de colheita da biomassa algal por centrifugação decresce ao longo do tempo de cultivo.

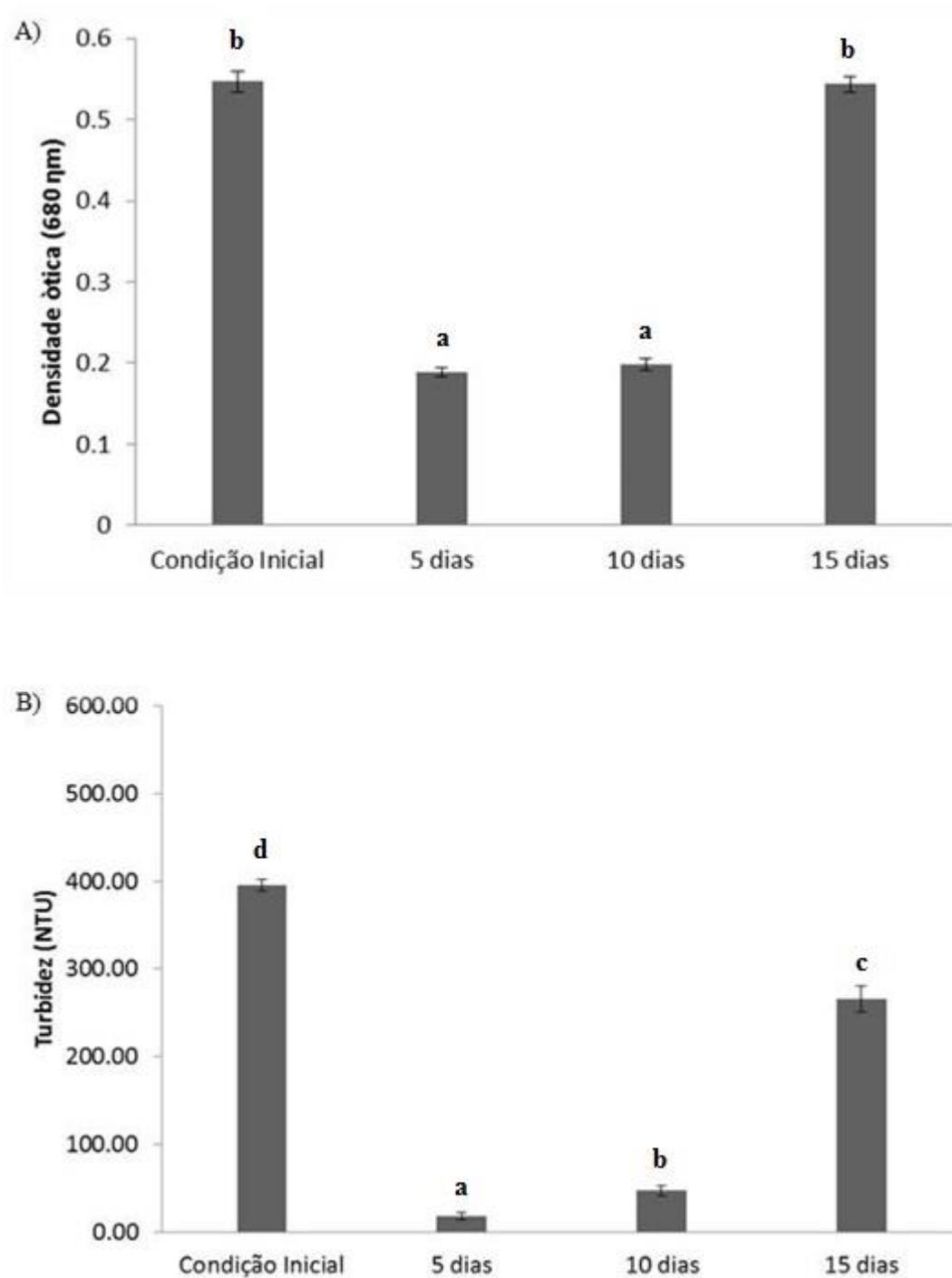


Figura 12 – Avaliação da concentração de sólidos em suspensão por (A) densidade óptica e (B) turbidez no ELE-POME antes e após o cultivo com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). 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).

4.4 CULTIVO DA CEPA *Tetranephris sp.* EMBRAPA|LBA 52 EM FOTOBIOREACTORES DE PLACAS PLANAS

A cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 foi cultivada em fotobiorreatores *air lift* com geometria em placas planas, em bateladas independentes, por 5, 10 e 15 dias utilizando 13L de Efluente da Lagoa de Estabilização do POME (ELE-POME) ou meio BBM (controle), suplementados com CO₂. A Figura 13 apresenta os gráficos de crescimento baseado em dados consolidados das 3 bateladas. A medição do crescimento algal por densidade óptica (13A), número de células (13B) e rendimento de biomassa (peso seco) (13C) gerou gráficos de crescimento com padrões similares no crescimento algal entre o meio BBM e o ELE-POME. Nota-se que a cepa esteve em fase exponencial de crescimento até o 5º dia de experimento.

A densidade óptica máxima da cultura em BBM chegou a $1,49 \pm 0,01$ e em ELE-POME $1,72 \pm 0,02$. A Figura 13B traz a interpolação do número de células/ml de meio, no qual a cultura em BBM obteve maior resultado no 10º dia, tendo alcançado pouco mais de $80 \pm 2,55 \times 10^6$ de celmL⁻¹, já o resultado em ELE-POME foi maior também no 10º dia com $10 \pm 1,90 \times 10^7$ de celmL⁻¹. O gráfico 13C apresenta o rendimento da biomassa máximo de $2.249 \pm 22,52$ mgL⁻¹ em BBM e de $2.504,67 \pm 143,20$ mgL⁻¹ em ELE-POME, no 10º e 15º dia de cultivo, respectivamente.

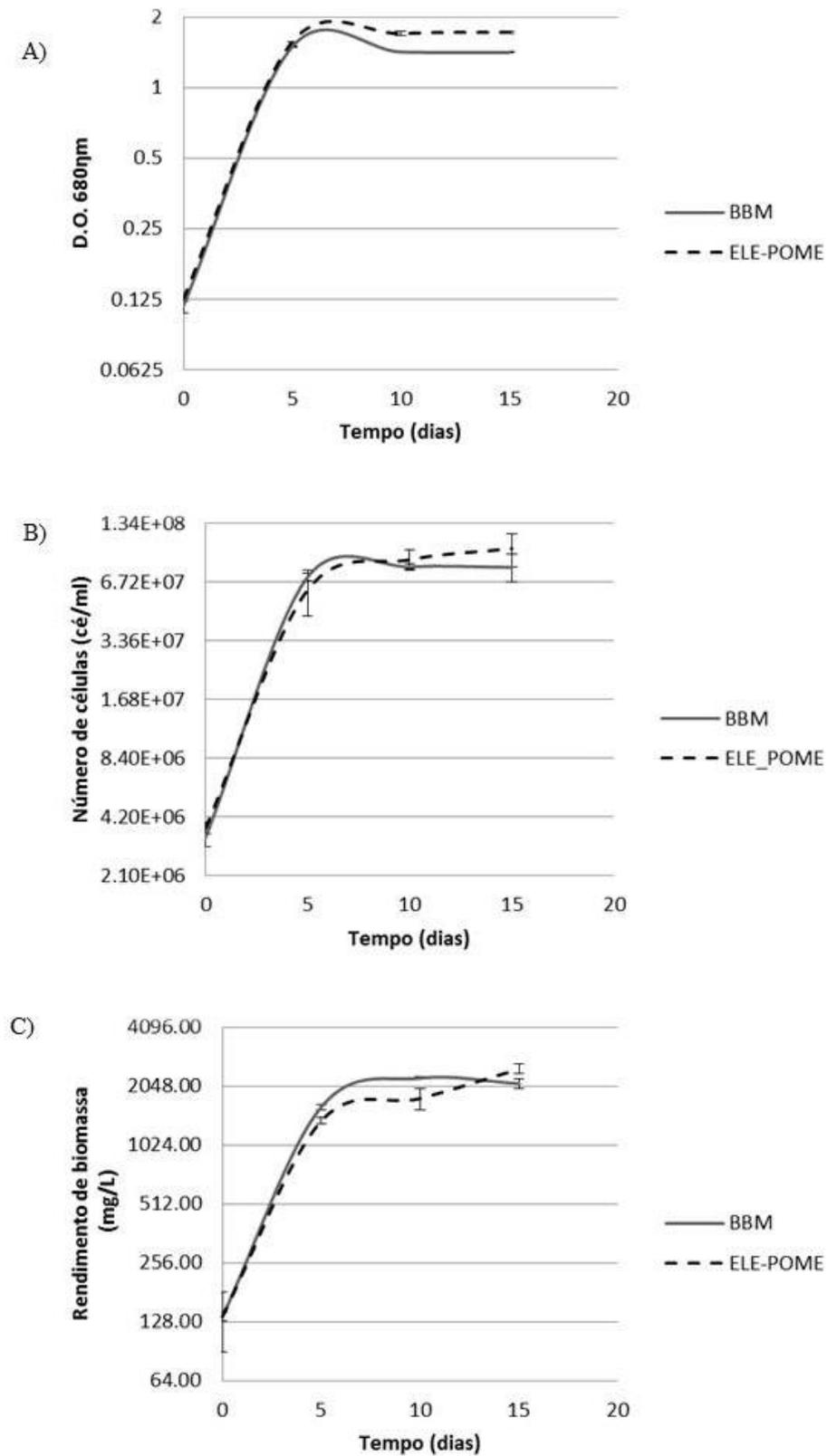


Figura 13 - Curva de crescimento baseada em A) Densidade óptica; B) número de células (célml^{-1}) C) Peso seco (mgL^{-1}), da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa/LBA52 cultivada em fotobiorreatores *air lift* por 5, 10 e 15 dias em meio BBM e ELE-POME. Com a aeração feita por injeção de ar atmosférico e suplementação de 5% de CO_2 , regime 12h/12h do ciclo claro/escuro e temperatura de $35\pm 1^\circ\text{C}$ durante a iluminação e $25\pm 1^\circ\text{C}$ durante o escuro.

Os dados de produtividade da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 são apresentados na Tabela 6. As análises estatísticas demonstraram que tanto no cultivo em BBM como em ELE-POME há diferença significativa de produtividade entre os tempos de cultivo, sendo o de 5 dias significativamente superior aos demais tempos. A produtividade de biomassa em BBM foi significativamente superior à observada em ELE-POME nos tempos de 5 e 10 dias, no entanto, não se verificou diferença significativa entre os meios no cultivo de 15 dias. É possível observar pelas taxas específicas de crescimento, que as culturas foram mais vigorosas no tempo de 5 dias.

Tabela 6 - Produtividade de biomassa em mg/L/dia da cepa *Tetranephris sp* Embrapa|LBA52

| Meio | Produtividade (mg/L/dia) | | | Taxa específica de crescimento (μ /dia) | | |
|-----------------|--------------------------|----------------------|---------------------|--|-----------------|-----------------|
| | 5 dias | 10 dias | 15 dias | 5 dias | 10 dias | 15 dias |
| BBM | 286,87 \pm 9,13aA | 218,83 \pm 1,99bA | 134,91 \pm 7,86cA | 0,60 \pm 0,02 | 0,36 \pm 0,02 | 0,21 \pm 0,02 |
| ELE-POME | 246,13 \pm 16,72aB | 183,73 \pm 11,80bB | 138,09 \pm 3,61cA | 0,42 \pm 0,07 | 0,28 \pm 0,02 | 0,12 \pm 0,02 |

Cultivo realizado em fotobiorreatores *air lift* em bateladas independentes por 5, 10 e 15 dias em meio BBM e ELE- POME. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35 \pm 1°C durante a iluminação e 25 \pm 1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). A análise estatística foi realizada com ANOVA de fator duplo com repetição, e foi usado o teste de Tukey para comparação entre as médias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05) entre os tempos de cultivo, para o mesmo meio. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p <0,05) entre os meios, para o mesmo tempo de cultivo.

4.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NUTRIENTES ORGÂNICOS E INORGÂNICOS PRESENTES NO SOBRENADANTE DE PÓS-CULTIVO DA CEPA *Tetranephris sp.* EMBRAPA|LBA 52

Os sobrenadantes pós-colheita dos cultivos em ELE-POME da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 realizados em fotobiorreatores por 5, 10 e 15 dias foram analisados quanto à DQO, DBO, Carbono orgânico total, nitrogênio, fósforo, potássio e pH. A tabela 7 mostra comparativamente os resultados de cada ensaio juntamente com os dados do efluente antes do tratamento. É possível notar redução de até 76,74%, 88,85%, 65,82% nas concentrações de nitrito, nitrogênio amoniacal e nitrogênio total. As concentrações de potássio não apresentaram variação significativa em nenhum dos tempos analisados. Também houve redução de nitrato, fosfato e fósforo total. A redução no pH do meio foi significativa no cultivo com 15 dias. Com relação à DQO, DBO e carbono orgânico total há aumento

significativo ao longo do tempo. No entanto, esta variação é menor do que a observada nos cultivos com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 (Tabela 5).

Tabela 7 - Análise do efluente de cultivo da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52

| Ensaio | Condição Inicial (ELE-POME) | 5 dias | 10 dias | 15 dias |
|--|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| DBO (mg O₂L⁻¹) | 20,8±1,70 a | 40,05±3,75 b | 84,15±17,18 c | 80,20±6,36 c |
| DQO (mg O₂L⁻¹) | 667,00±7,07 a | 786,00±4,24 b | 802,00±0,00 b | 921,50±2,12 c |
| Carbono Orgânico Total (mgL⁻¹) | 3680,70±243,39 a | 12521,60±1751,36b | 17200,00±1362,17b | 15686,20±1946,24b |
| Nitrogênio Total (mgL⁻¹) | 79,19±6,15 b | 30,71±0,22 a | 29,22±2,48 a | 32,31±0,45 a |
| Nitrato (mgL⁻¹) | 0,72±0,00 b | 0,59±0,04 a | 0,70±0,03 b | 0,66±0,0 ab |
| Nitrito (mgL⁻¹) | 0,215±0,01 | ND* | ND* | ND* |
| Nitrogênio Amoniacal (mgL⁻¹) | 44,85±0,64 | ND** | ND** | ND** |
| Fósforo Total (mgL⁻¹) | 20,13±0,88 d | 0,79±0,08 a | 1,28±0,03 b | 2,40±0,00 c |
| Fosfato (mgL⁻¹) | 56,75±2,47 d | 1,86±0,06 b | 1,42±0,01 a | 5,25±0,07 c |
| Potássio (mgL⁻¹) | 1850,00±70,71 a | 1850,00±70,71 a | 1825,00±35,36 a | 1750,00±212,13 a |
| pH | 9,17±0,01 c | 9,08±0,02 c | 8,56±0,01 b | 8,06±0,12 a |

Análise da composição do ELE-POME antes e após o cultivo com a cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). A análise estatística foi realizada com ANOVA de fator único com repetição, e foi usado o teste de Tukey para comparação ao longo do tempo entre as médias. Letras diferentes (a, b, c) indicam diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de cultivo avaliados (p < 0,05). ND* = não detectado (concentração < 0,05); ND** = não detectado (concentração < 5,00);

As Figuras 14A e 14B apresentam as taxas de remoção da carga orgânica e inorgânica (N, P e K) dos cultivos por 5, 10 e 15 dias da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. 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 (5º dia de cultivo). Por outro lado, as concentrações de N e P apresentaram reduções significativas, de 60% e 90% respectivamente. A concentração do potássio não variou significativamente ao longo do tempo de cultivo. Comparando as Figuras 13 e 14 verifica-se que à medida que as células algais entram em fase estacionária de crescimento, há aumento concomitante da carga orgânica do meio.

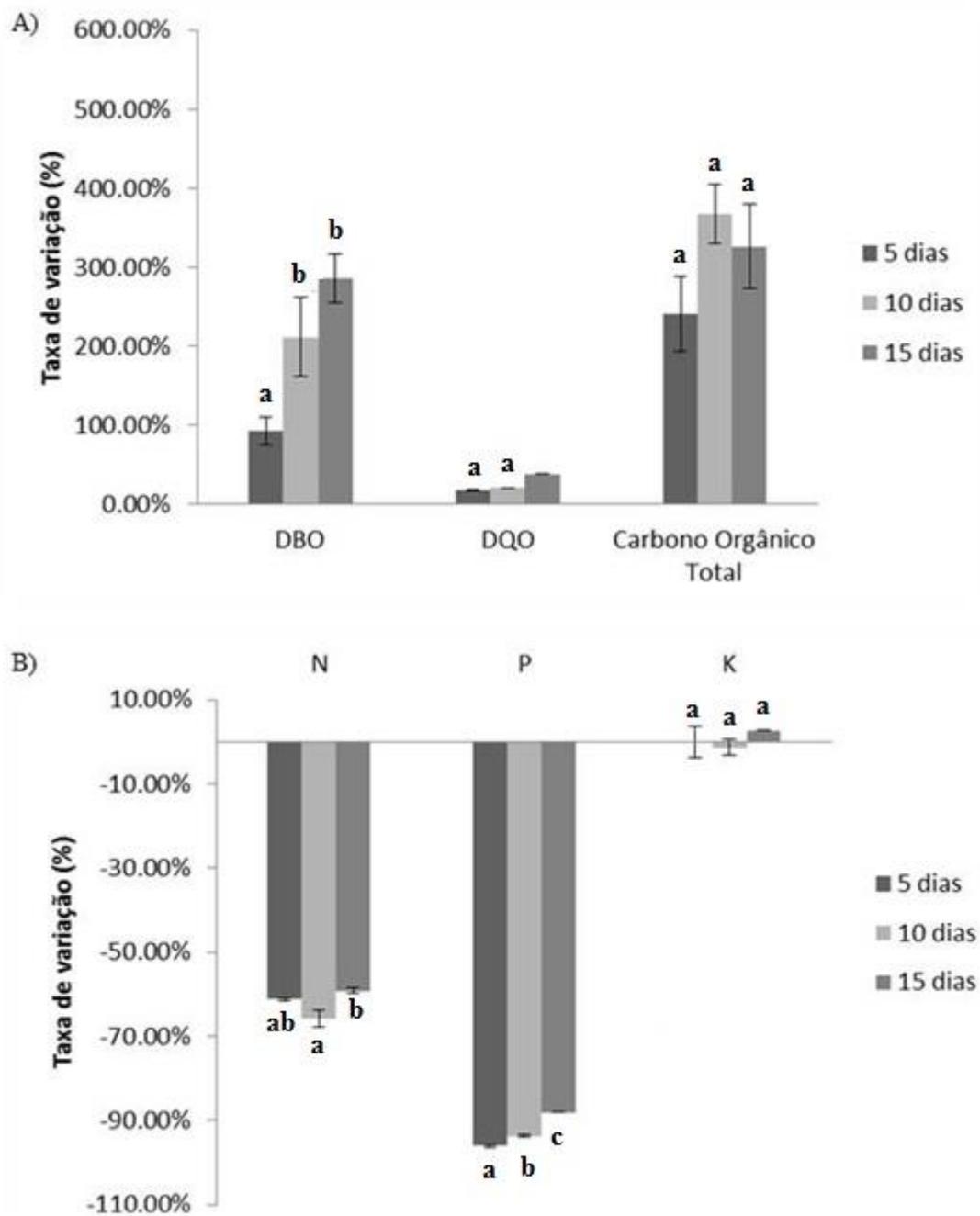


Figura 14 - Percentual de variação na composição do ELE-POME após o cultivo com a cepa *Tetranephris sp* EmbrapaLBA52 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores *air lift* de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). 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).

4.6 AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS DO ELE-POME APÓS O CULTIVO E COLHEITA DA BIOMASSA DA CEPA *Tetranephris sp.* EMBRAPA|LBA 52

Foi analisada a eficiência de remoção de sólidos suspensos dos sobrenadantes pós-colheita dos cultivos em ELE-POME da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 realizados em fotobiorreatores por 5, 10 e 15 dias por meio de medidas de densidade óptica a 680 nm (Figura 15A) e turbidez (Figura 15B). Foi observada redução na densidade óptica de até 67,30% e de turbidez de 75,70%, ambas no cultivo com 5 dias. Os resultados indicam que a remoção de sólidos suspensos foi maior nos tempos iniciais de cultivo (5 e 10 dias), sugerindo que a eficiência de colheita da biomassa algal por centrifugação decresce ao longo do tempo de cultivo.

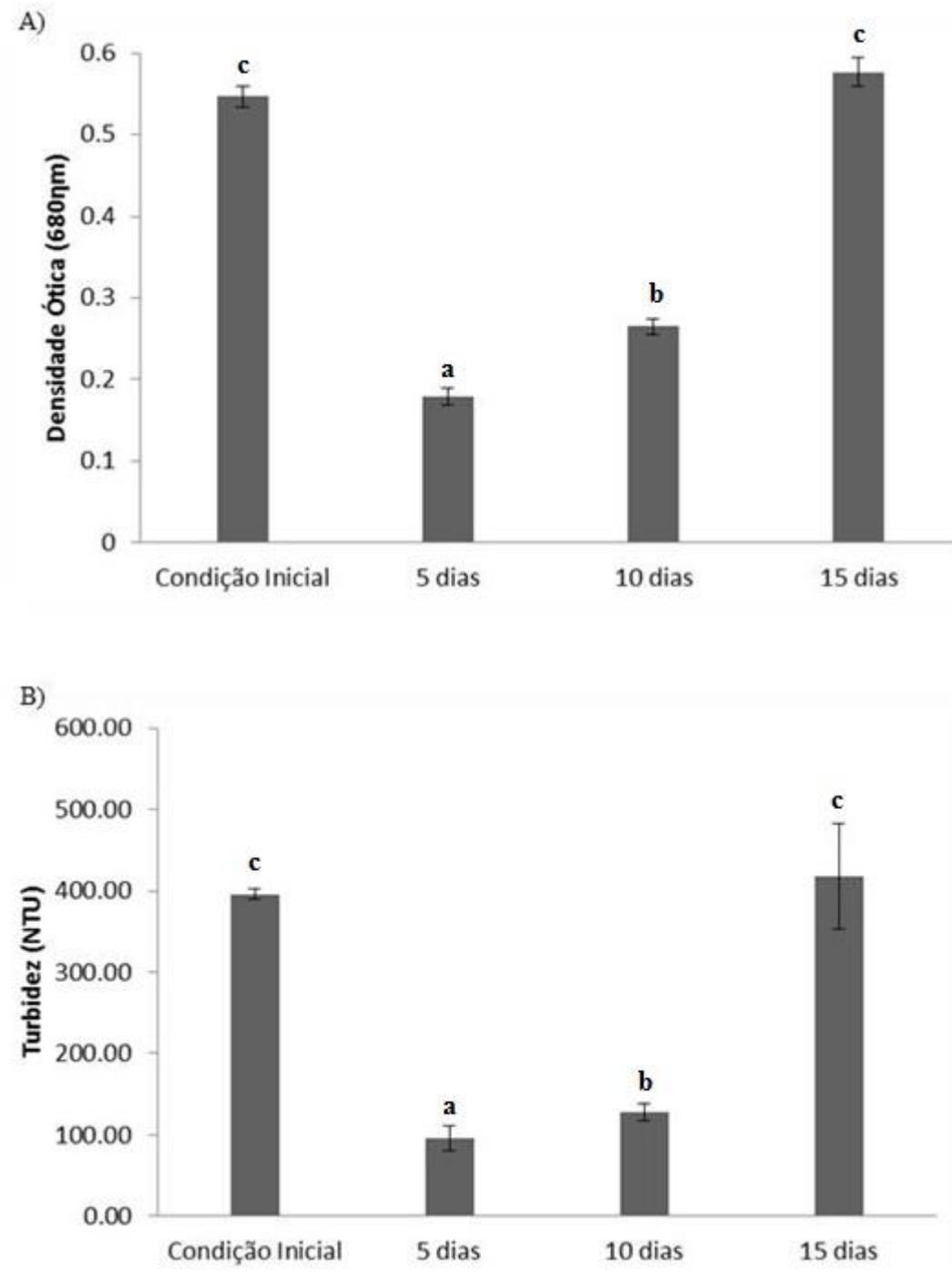


Figura 15 - Avaliação da concentração de sólidos em suspensão no ELE-POME antes e após o cultivo com a cepa *Tetranephris sp* Embrapa|LBA52 durante 5, 10 e 15 dias em fotobiorreatores air lift de placas planas. A aeração foi realizada por injeção de ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂, regime de iluminação de 12h/12h de ciclo claro/escuro e temperatura de 35±1°C durante a iluminação e 25±1°C durante o escuro. Os resultados são apresentados como médias de triplicatas (n = 3). 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).

5 DISCUSSÕES

Há expectativa de que a indústria de base biológica ganhe destaque ao longo deste século, provendo alimentos, energia e materiais para a crescente população mundial. Neste contexto, o processamento industrial em um conceito de biorrefinaria, onde a biomassa é transformada em vários produtos comercializáveis, otimizando o uso dos recursos e minimizando a geração de resíduos, seria ampliado e consolidado (BRASIL *et al.*, 2016). Dentre as matérias-primas com potencial para suprir estas demandas, as microalgas destacam-se pela sua alta produtividade de biomassa, baixo impacto direto e indireto sobre o uso de terras agricultáveis e capacidade de crescimento em águas residuárias. Tais características associadas ao fato de que o cultivo e o processamento algal podem ser realizados em um mesmo local geram oportunidades para o desenvolvimento de biorrefinarias algais associadas a instalações industriais pré-existentes, como usinas sucro-alcooleiras, usinas de biodiesel e a indústria petroquímica (BRASIL *et al.*, 2016). De fato, Santana (2016) demonstrou a seleção e cultivo de cepas de microalgas com alto teor de proteínas e carboidratos em meio à base de vinhaça, abundante efluente da indústria sucro-alcooleira. De maneira similar Liang e colaboradores (2009) reportaram que a suplementação do meio de cultivo de *Chlorella vulgaris* com glicerol, resíduo da indústria de biodiesel, aumenta a produtividade de biomassa algal. Já Arriada e colaboradores (2014), demonstraram a adaptação de uma cepa de *Nannochloropsis oculata* para crescimento em água produzida do resíduo da exploração de petróleo e gás natural. No presente trabalho, foi avaliado o potencial de integração do cultivo de microalgas à agroindústria de palma-de-óleo por meio do aproveitamento de seus efluentes líquidos.

Especificamente, foi mensurada a capacidade de produção de biomassa e biorremediação de efluente de lagoa de estabilização de POME. Fazendo uma comparação entre os meios de cultivo estudados, não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento (Figura 10C) e na produtividade de biomassa (Tabela 4) da cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 quando cultivadas em meio BBM ou ELE-POME. Estes resultados sugerem que os nutrientes presentes no ELE-POME são suficientes para garantir um crescimento algal vigoroso desta cepa. Já a cepa *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA52, apresentou diferença significativa no crescimento (Figura 13C) e na produtividade (Tabela 6) nos tempos de 5 e 10 dias, sendo o resultado obtido no meio BBM 14% superior ao ELE-POME, essa diferença de produtividade se torna pouco compensatória quando se compara os custos de produção do

meio sintético em larga escala, com um meio de cultivo que se trata de efluente de um processo industrial. Para o tempo de 15 dias não houve diferença significativa nas variáveis analisadas. No entanto, mesmo o meio utilizado tendo sido menos eficiente que o sintético para *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52, sua produtividade máxima obtida em ELE-POME (de 246,13 mg/L/dia) foi maior do que a observada com a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 (de 143,00 mg/L/dia). A superioridade de produtividade desta cepa poderia ser explicada pela origem autóctone (nativa) da cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52, que foi isolada de lagoa aeróbia da mesma agroindústria onde foi obtido o ELE-POME. Algo semelhante foi observado por Almomani e Örmeci (2016) que testaram a capacidade de remoção de N e P das cepas de microalgas *Chlorella vulgaris*, *Neochloris oleoabundans* e compararam com um misto de microalgas indígenas do efluente de uma estação de tratamento de águas residuais. O grupo de algas nativas composto em sua maioria por cepas de *Tribonema sp.*, *Oedogonium sp.*, *Microspora sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Aphanocapsa sp.*, e *Scenedesmus sp.* efluente foi mais eficiente na remoção dos compostos e apresentaram fase adaptativa menor. Microrganismos autóctones já estão adaptados às condições oferecidas pelo efluente, o que reflete em vantagem deste tipo de cepa na produção de biomassa e conseqüentemente na assimilação de nutrientes do meio. Santana (2016) demonstrou que a cepa *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40, coletada de lagoas de estabilização de vinhaça, possui alta produtividade de biomassa quando cultivada no efluente da produção de etanol.

É importante ressaltar que as produtividades obtidas neste estudo, em especial a apresentada pela cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52, são superiores àquelas relatadas na literatura. Por exemplo, Wu e colaboradores (2012) relataram o cultivo de *Chlamydomonas sp.* em efluente de estação de tratamento de água, no qual obtiveram $150 \text{ mgL}^{-1}\text{dia}^{-1}$ de produtividade de biomassa. Já Ledda e colaboradores (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 $220 \text{ mgL}^{-1}\text{dia}^{-1}$. A formulação, chamada pelos autores de UFL, consistia do permeado após ultrafiltração do efluente digerido de uma planta de biogás. Ding e colaboradores (2016) cultivaram uma cepa de *Chlamydomonas sp.* em POME diluído em três concentrações diferentes, e obtiveram como produtividade máxima $101,89 \text{ mgL}^{-1}\text{dia}^{-1}$.

O efluente POME utilizado neste trabalho é proveniente da saída (jusante) de lagoa anaeróbia da usina de óleo de palma (Figura 6). Assim, o líquido tem como característica a baixa carga orgânica em relação ao POME bruto (Tabela 8). A baixa carga orgânica contribuiu positivamente para o crescimento algal nos fotobiorreatores em condições não-

axênicas ao limitar contaminações por microrganismos heterotróficos competidores, como fungos e bactérias. Chiu e colaboradores (2015) afirmam que o crescimento de microalgas pode ser inibido pela presença de bactérias, protozoários e fungos, quando há altas taxas de matéria orgânica presentes no meio. A competição por nutrientes provocada pela biota do efluente, seja ela natural ou produzida durante o processo, acaba sendo um dos fatores negativos da utilização deste tipo de meio. Testes em escala de bancada são facilmente controlados por tratamento em autoclave (condições axênicas), no entanto, normalmente é muito oneroso para ser utilizado em escalas maiores.

Estudo prévio de Cereijo (2016) demonstrou que as microalgas *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris* sp. Embrapa|LBA 52 crescem em ELE-POME de forma dependente de luz. Além disso, no presente estudo verificou-se que não há redução na DBO, DQO ou carbono orgânico presentes no ELE-POME durante o cultivo destas microalgas (Tabelas 5 e 7). Em conjunto, estes dados sugerem que o crescimento algal se dê de maneira fotoautotrófica neste efluente. Este tipo de bioprocessos favorece o escalonamento, já que a competição por nutrientes citada por Chiu e colaboradores (2015) não ocorre, em razão do meio não ser rico em matéria orgânica. Brasil e colaboradores (2016) afirmam que a utilização de efluentes como meio de cultivo para microalgas em larga escala só é viável quando o material passa por biodigestão prévia. Para Wang e colaboradores (2016), bioprocessos foto-autotróficos podem ser produtivos quando o fotobiorreator apresentar alta taxa de transferência de luz, como observado por Xia e colaboradores (2013) que obtiveram produtividade de biomassa de 212,1 mgL⁻¹dia⁻¹ em cultura foto-autotrófica de *Scenedesmus obtusus* com fotobiorreatores colunas de bolhas de 140 litros.

A legislação vigente que determina os padrões para o lançamento de efluentes em corpos hídricos está disposta na resolução CONAMA N° 430/2011. De acordo com o texto da norma, todo o efluente de qualquer fonte poluidora deve passar por tratamento, e este não deve alterar os padrões de qualidade do corpo receptor, que tem os padrões descritos na resolução CONAMA N° 357/2005. As análises feitas no presente trabalho não contemplam todas as análises exigidas pelas normas citadas, contudo, a tabela 8 compara os resultados obtidos pelo tratamento algal do trabalho com alguns dos padrões definidos pela legislação vigente.

Tabela 8 – Comparação entre os padrões de qualidade de água doce classe I, segundo resolução N° 357/05 CONAMA, exigências para o descarte de efluentes agroindustriais segundo a resolução N° 430/11 CONAMA e as composições do POME antes e depois do tratamento de cinco dias com *C. biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris sp* Embrapa|LBA 52.

| PARÂMETRO | CONAMA RESOLUÇÃO N° 357/05 | CONAMA RESOLUÇÃO N° 430/11 | POME IN NATURA | ELE- POME | SOBRENADANTE DO CULTIVO DE 5 DIAS LBA 40 | SOBRENADANTE DO CULTIVO DE 5 DIAS LBA 52 |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------|--|--|
| DBO (mg O ₂ /L) | Até 3,00 | ≥60%*** | 48.510,00 | 20,80 | 38,70 | 40,05 |
| Nitrato (mg/L) | 10,00 | - | 24,80 | 0,72 | 0,71 | 0,53 |
| Nitrito (mg/L) | 1,00 | - | <0,50 | 0,22 | <0,05 | <0,05 |
| Nitrogênio Amoniacal (mg/L) | 0,50 – 3,70 * | 20,00 | 100,00 | 44,85 | <5,00 | <5,00 |
| Fósforo Total (mg/L) | 0,10** | - | - | 20,13 | 1,03 | 0,79 |
| pH | 6,00 – 9,00 | - | 4,58 | 9,17 | 8,37 | 9,08 |
| Turbidez (NTU) | Até 40 | - | 26.250,00 | 395,50 | 18,10 | 96,10 |

* 3,70 mg/L N – (pH ≤ 7,5); 2,00 mg/L N (7,5 < pH ≤ 8,0); 1,00 mg/L N (8,0 < pH ≤ 8,5); 0,50 mg/L N (pH > 8,5).

** ambiente lótico: ambiente relativo a águas continentais moventes. *** remoção mínima

A partir dos dados apresentados nas Tabelas 5 e 7 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 (Figuras 10 e 13). Neste período, as células estão em atividade metabólica máxima a maquinaria celular está produzindo grandes quantidades de moléculas essenciais (ATP, proteínas, DNA) para o desenvolvimento da cultura e então, para construção de tais compostos, N e P são componentes essenciais (CHIU *et al.*, 2015; MOLINUEVO-SALCES *et al.*, 2016).

Arora e colaboradores (2016) avaliaram a influência das concentrações de nitrogênio (N) e fósforo (P) no crescimento algal. Foram utilizadas oito combinações de N e P em meio sintético, sendo a que apresentou maior produtividade de biomassa ($119 \pm 0,3 \text{ mgL}^{-1}\text{dia}^{-1}$) aquela com maior quantidade de nitrogênio (250 mgL^{-1}) e fósforo (75 mgL^{-1}). Resultados que indicam que ambos afetam a taxa de crescimento algal. As concentrações utilizadas pelos autores são maiores do que as encontradas no ELE-POME (Tabela 5). Ainda assim, a produtividade das cepas *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 foi superior (Tabelas 4 e 6).

As taxas de remoção atingiram mais de 88,85% de nitrogênio amoniacal, 64,13% de nitrogênio total, para *Chlamydomonas biconvexa* Embrapa|LBA 40 (Figura 11 e Tabela 5). Para a cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 mais de 88,85% nitrogênio amoniacal, 63,89% em nitrogênio total (Figura 13). Ding e colaboradores (2016) obtiveram com o cultivo de *Chlamydomonas sp.* em POME, taxas de remoção de nitrogênio amoniacal, nitrogênio total equivalentes a 100% e 72,97%, respectivamente. No presente trabalho, os cultivos com as duas cepas obtiveram concentrações finais de nitrogênio amoniacal abaixo de 5 mgL^{-1} (Tabela 8). Dentre todas as fontes de nitrogênio presentes no meio, a quantidade em mgL^{-1} de nitrogênio amoniacal foi a que sofreu maior redução. Segundo Ding e colaboradores (2016) isso ocorre porque o nitrogênio amoniacal tem assimilação metabólica menos custosa energeticamente. No entanto, é importante ressaltar que a redução observada não necessariamente indica assimilação do composto pelas células algais. Segundo Ledda e colaboradores, (2015) o sistema de aeração e a elevação do pH provocam a perda de amônia para a atmosfera. De fato, Ledda e colaboradores (2015) constataram que apenas 30% do nitrogênio amoniacal haviam sido incorporados pelas células algais após o cultivo em tanques aerados. No presente trabalho houve redução significativa do pH, sendo o cultivo com 15 dias o que apresentou maior redução, este fenômeno pode ser atribuído ao aumento de CO_2 (SWARNALATHA *et al.*, 2015) no meio, devido a assimilação pelas algas que já estavam na fase estacionária do metabolismo (Figuras 10 e 13).

O nitrato é a forma de nitrogênio mais estável em solução aquosa e normalmente é um nutriente importante para seres autotróficos. Porém, comparando as concentrações do composto no meio antes e depois dos cultivos da cepa *Tetranephris sp.*, foi possível notar que não houve redução significativa na sua concentração (Tabela 5). Em contrapartida, as concentrações de nitrito foram consideravelmente reduzidas. Este composto é o intermediário entre o amônio e o nitrato e também pode ser assimilado como nutriente por microalgas. De fato, Vilchez e Vega (1995) relataram a capacidade de cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* assimilarem nitrito como fonte de nitrogênio. Li e colaboradores (2016) desenvolveram uma cepa de *Chlorella sp.* adaptada ao meio com altas concentrações de nitrito. Segundo os autores, a variedade seria eficiente na remoção de NO_x .

As taxas de remoção de fosfato atingiram 97,92% e 97,49% com *C. biconvexa* e *Tetranephris sp.*, respectivamente. A variação da concentração de fósforo total nos cultivos de ambas as cepas foi de 96%, o que equivale a $19,32 \text{ mgL}^{-1}$ de redução (Figuras 10 - 13). Ding e colaboradores (2016) obtiveram até 63,53% de remoção de fósforo total por uma cepa de *Chlamydomonas sp.* em POME diluído com água destilada (12,5%). Almomani; Örmeci

(2016) no cultivo misto de *Tribonema sp.*, *Oedogonium sp.*, *Microspora sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Aphanocapsa sp.*, e *Scenedesmus sp.* de cepas autóctones de esgoto doméstico observaram remoção de fósforo total equivalente a 70% no efluente primário da estação de tratamento, 30,8% no efluente secundário e 50% no efluente da desidratação de lodo digerido anaerobicamente.

Observou-se também que em todos os cultivos houve aumento na DBO e DQO com o aumento no tempo de cultivo (Tabelas 5 e 7). Este aumento foi mais acentuado após o final da fase exponencial de crescimento algal (Figuras 9 e 12). Segundo CONAMA (2011) o tratamento do efluente deve garantir a redução de 60% da DBO inicial (Tabela 8). Pode-se hipotetizar a contribuição de dois fatores para este 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). A contribuição do primeiro fator é corroborada por estudos que demonstram a secreção de polissacarídeos no sobrenadante de cultivo de microalgas. Bafana (2013) obteve produção de ácido galacturônico, ribose, arabinose, xilose, glicose, galactose e ramanose excretados de *Chlamydomonas reinhardtii*. Villay e colaboradores (2013) observaram produção extracelular de xilose em cultivo de *Rhodella violacea*. O trabalho de Barnech e colaboradores (2016) por sua vez, concluiu que a maior produção de polissacarídeos extracelulares por *Navicula cincta* ocorreu na fase estacionária do cultivo, quando o meio apresentava baixa concentração de fosfato, produzindo glicopeptídeos. Algo similar poderia ocorrer durante o cultivo das microalgas *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 em ELE-POME, principalmente o que foi visto em Barnech e colaboradores (2016). Porém, análises específicas para identificação da natureza destes compostos secretados ainda precisam ser realizadas para comprovar esta hipótese.

Por outro lado, a baixa eficiência da colheita da biomassa algal nos períodos mais tardios de cultivo poderia constituir um segundo fator que contribuiria para o aumento da carga orgânica do sobrenadante do cultivo. De fato, análises de turbidez e densidade óptica do sobrenadante das *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA52 cultivadas em ELE-POME indicam aumento de sólidos em suspensão ao longo do tempo de forma concomitante ao aumento da carga orgânica.

A recuperação da biomassa por centrifugação envolve o uso da força centrífuga para acelerar a taxa de sedimentação, sendo a separação baseada no tamanho da célula e na diferença de densidade entre a biomassa e o meio (GERARDO *et al.*, 2015). A colheita por

centrifugação apresenta alta eficiência (>90%), no entanto, o gasto energético é alto. Dependendo da espécie e das condições de cultura, a colheita da biomassa pode corresponder a 30% do custo de produção (DASSEY e THEEGALA, 2013). Segundo estes autores, a colheita de algas pode ser feita em vários ciclos de centrifugação, com variações nas taxas de fluxo de passagem da centrífuga. Os autores sugerem que aumentando a concentração do material, a demanda de energia é menor. Seguindo esta perspectiva, alguns autores têm sugerido a pré-concentração do material a partir da floculação/sedimentação. No trabalho de Xu e colaboradores, mais de 95% da energia necessária para a colheita de *Chlorella sorokiniana* por centrifugação foi poupada com a floculação à base de quitosana como etapa de pré-concentração.

Lei e colaboradores (2015) desenvolveram uma metodologia de biofloculação para *Chlorella vulgaris* a partir do sobrenadante de cultivo da bactéria *Cobetia marina*. A eficiência da flotação foi de 92,7% com 20 mgL⁻¹ de agente floculante. Já Misra e colaboradores (2015) aplicaram métodos eletroquímicos na colheita de *Scenedesmus obliquus* com eficiência de remoção de 83% e menor consumo de energia, comparando com as técnicas convencionais. De fato, acoplar uma etapa anterior à centrifugação provavelmente reduziria a concentração de material particulado, o que conseqüentemente facilitaria a remoção da biomassa e redução de material orgânico final no sobrenadante.

Tomados em conjunto, os resultados aqui apresentados sugerem que o ponto de máxima produtividade de biomassa e máxima remoção de nutrientes inorgânicos coincidem, determinado assim um único ponto ótimo de colheita. Estes 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 destas microalgas. De fato, o aproveitamento da biomassa gerada para produção de pigmentos, energia, químicos ou materiais contribuiria para a consolidação de um modelo de biorrefinaria custo-eficiente e sustentável.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados descritos neste trabalho, é possível concluir que o Efluente da Lagoa de Estabilização do POME (ELE-POME) pode ser utilizado como meio de cultura para a produção de biomassa das microalgas *C. biconvexa* Embrapa|LBA40 e *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52, sem necessidade de suplementação. A cepa *Tetranephris sp.* Embrapa|LBA 52 apresentou maior rendimento e produtividade de biomassa. 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. Estes achados tornam atrativa a integração do cultivo algal à cadeia de palma-de-óleo em um contexto de biorrefinaria. O aumento na DBO, DQO e carbono orgânico total são indícios de acúmulo de carboidratos secretados pelas células, bem como de debris celulares e células mortas ao longo do tempo de cultivo. Como perspectivas, os próximos trabalhos devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar a composição a biomassa algal produzida e o seu potencial como matéria-prima para bioprodutos de valor agregado, bem como o escalonamento e a técnica de colheita que melhor se adapte a cada cepa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF, N. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 257–275, 2012. King Saud University.

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 de maio 2016.

ADI, N.; NOGUCHI, R. Comprehensive evaluation of integrated energy plantation model of palm oil and microalgae based biofuel for sustainable energy production. **Energy Procedia**, v. 68, p. 226–235, 2015.

AHMED, Y.; YAAKOB, Z.; AKHTAR, P.; SOPIAN, K. Production of biogas and performance evaluation of existing treatment processes in palm oil mill effluent (POME). **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1260–1278, 2015.

AL-HASHIMI, P. M. A. I.; HAYDER, E.; HUSSAIN, T. Stabilization pond for wastewater treatment. **European Scientific Journal**, v. 9, n. 14, p. 278–294, 2013.

ALMOMANI, F. A.; ÖRMECI, B. Performance Of *Chlorella Vulgaris* , *Neochloris Oleoabundans* , and mixed indigenous microalgae for treatment of primary effluent , secondary effluent and centrate. **Ecological Engineering**, v. 95, p. 280–289, 2016.

ALZATE, M. E.; MUÑOZ, R.; ROGALLA, F.; FDZ-POLANCO, F.; PÉREZ-ELVIRA, S. I. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 405–410, 2013.

ARORA, N.; PATEL, A.; PRUTHI, P. A.; PRUTHI, V. Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in *Chlorella minutissima* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 79–87, 2016.

ARRIADA AA, ABREU PC. *Nannochloropsis oculata* growth in produced water: an alternative for massive microalgae biomass production. *Braz J Petrol Gas*;8(3):19–25. 2014

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: Estimativa de custos e perspectiva de custos para o Brasil**, 2012. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BAFANA, A. Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 2, p. 746–752, 2013.

BARNECH, G.; POPOVICH, C. A.; RODRÍGUEZ, M. C.; et al. Simultaneous production assessment of triacylglycerols for biodiesel and exopolysaccharides as valuable co-products in *Navicula cincta*. **ALGAL**, v. 15, p. 120–128, 2016.

BORGES, A. D. J.; COLLICCHIO, E.; CAMPOS, G. A. A cultura da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil e no mundo : aspectos agrônômicos e. **Revista Liberato**, v. 17, p. 66–77, 2016.

BRASIL, B. S. A. F.; SILVA, F. C. P.; SIQUEIRA, F. G. Microalgae biorefineries: The Brazilian scenario in perspective. **New Biotechnology**, 2016.

BRUNALE, P. P. DE M. **O isolamento das microalgas e o seu cultivo em vinhaça para produção de biocombustíveis e biorremediação**, 2014. 56f. Dissertação - União Latino-americana de Tecnologia. Arapoti/PR.

CEREIJO, C. R. **Seleção e cultivo de microalgas nos efluentes agroindustriais da produção do óleo de palma e de mandioca**, 2016. 58f. Dissertação - Universidade Federal do Tocantins. Brasília/DF

CHIN, M. J.; POH, P. E.; TEY, B. T.; CHAN, E. S.; CHIN, K. L. Biogas from palm oil mill effluent (POME): Opportunities and challenges from Malaysia's perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 717–726, 2013.

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

CONAMA, Resolução N° 357, de 17 de março de 2005 Publicada no DOU n° 053, de 18/03/2005, págs. 58-63. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 08 de maio 2016.

CONAMA, Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 08 de maio 2016.

DASSEY, A. J.; THEEGALA, C. S. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 241–245, 2013.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, 2010.

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

DOGARIS, I.; WELCH, M.; MEISER, A.; WALMSLEY, L.; PHILIPPIDIS, G. Bioresource Technology A novel horizontal photobioreactor for high-density cultivation of microalgae. **BIORESOURCETECHNOLOGY**, v. 198, p. 316–324, 2015.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 131–151, 2013.

GERARDO, M. L.; HENDE, V. DEN; VERVAEREN, H.; COWARD, T.; SKILL, S. C. Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and

case studies from pilot-plants. , v. 11, p. 248–262, 2015.

GLAZ, P.; BARTOSIEWICZ, M.; LAURION, I.; et al. Greenhouse gas emissions from waste stabilisation ponds in Western Australia and Quebec (Canada). **Water Research**, v. 101, p. 64–74, 2016.

HERNÁNDEZ, D.; SOLANA, M.; RIAÑO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.; BERTUCCO, A. Biofuels from microalgae : Lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. , v. 170, p. 370–378, 2014.

HO, S.; HUANG, S.; CHEN, C.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

JI, M.-K.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; KIM, S.-H.; et al. Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO₂ for nutrient removal and biomass production. **Ecological Engineering**, v. 58, p. 142–148, 2013.

KAMARUDIN, K. F.; TAO, D. G.; YAAKOB, Z.; et al. A review on wastewater treatment and microalgal by-product production with a prospect of palm oil mill effluent (POME) utilization for algae. **Der Pharma Chemica**, v. 7, n. 7, p. 73–89, 2015.

KAMYAB, H.; FADHIL, M.; KEYVANFAR, A.; ABD, M. Z. Efficiency of Microalgae *Chlamydomonas* on the Removal of Pollutants from Palm Oil Mill Effluent (POME). **Energy Procedia**, v. 75, p. 2400–2408, 2015.

KIM, S.; PARK, J.; CHO, Y.; HWANG, S. Growth rate , organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic , heterotrophic and mixotrophic conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 8–13, 2013.

KUNJAPUR, A. M.; ELDRIDGE, R. B. Photobioreactor Design for Commercial Biofuel Production from Microalgae. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 8, p. 3516–3526, 2010.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Renewable and sustainable bioenergies production from palm oil mill effluent (POME): Win – win strategies toward better environmental protection. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 124–141, 2011.

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**, 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**, v. 18, p. 15–24, 2016.

LEI, X.; CHEN, Y.; SHAO, Z.; et al. Effective harvesting of the microalgae *Chlorella vulgaris* via flocculation – flotation with bioflocculant. , v. 198, p. 922–925, 2015.

LEVERMANN, R. A.; PAULO, J.; SOUZA, M. DE. Óleo de palma - O crescimento da indústria global. **Agroanalysis**, p. 13–15, 2014.

LIANG Y, SARKANY N, CUI Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*;31:1043–9. 2009.

LI, T.; XU, G.; RONG, J.; et al. The acclimation of *Chlorella* to high-level nitrite for potential application in biological NO_x removal from industrial flue gases. **Journal of Plant Physiology**, v. 195, p. 73–79, 2016.

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, n. 1, p. 217–232, 2010.

MIGUEL, J. C. R. **Modelação e Optimização de uma Unidade de Produção de Microalgas**, 2011. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

MILANO, J.; CHYUAN, H.; MASJUKI, H. H.; CHONG, W. T.; KEE, M. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.

MISRA, R.; GULDHE, A.; SINGH, P.; et al. Evaluation of operating conditions for sustainable harvesting of microalgal biomass applying electrochemical method using non sacrificial electrodes. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 176, p. 1–7, 2015.

MOLINUEVO-SALCES, B.; MAHDY, A.; BALLESTEROS, M.; GONZ, C. From piggery wastewater nutrients to biogas: Microalgae biomass revalorization through anaerobic digestion. , v. 96, p. 1103–1110, 2016.

MORTEZAEIKIA, V.; YEGANI, R.; TAVAKOLI, O. Membrane-sparger vs . membrane contactor as a photobioreactors for carbon dioxide bio fi xation of *Synechococcus elongatus* in batch and semi-continuous mode. **Biochemical Pharmacology**, v. 16, p. 23–31, 2016.
NERY, V. DEL; DAMIANOVIC, M. H. Z.;

NERY, V. DEL; DAMIANOVIC, M. H. Z.; POZZI, E.; et al. Long-term performance and operational strategies of a poultry slaughterhouse waste stabilization pond system in a tropical climate. **“Resources, Conservation & Recycling,”** v. 71, p. 7–14, 2013. Elsevier B.V.

NURACHMAN, Z.; HARTINI, H.; RIDHANI, W.; et al. Tropical marine *Chlorella sp* . PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **ALGAL**, v. 10, p. 25–32, 2015.

NWUCHE, C. O.; EKPO, D. C.; EZE, C. N.; AOYAGI, H.; OGBONNA, J. C. Use of Palm Oil Mill Effluent as Medium for Cultivation of *Chlorella sorokiniana*. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 3, p. 305–316, 2014.

PHUNTSHO, S.; SHON, H. K.; VIGNESWARAN, S.; KANDASAMY, J. Wastewater stabilization ponds (wsp) for wastewater treatment. **Water and wastewater treatment technologies**, v. II, 2009.

POZZI, E.; et al. Long-term performance and operational strategies of a poultry slaughterhouse waste stabilization pond system in a tropical climate. **“Resources,**

Conservation & Recycling,” v. 71, p. 7–14, 2013.

PULZ, M. O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. , p. 635–648, 2004.

QI, F.; PEI, H.; HU, W.; MU, R.; ZHANG, S. Characterization of a microalgal mutant for CO₂ biofixation and biofuel production. **Energy Conversion and Management**, v. 122, p. 344–349, 2016.

REN, H.; LIU, B.; KONG, F.; ZHAO, L.; REN, N. Hydrogen and lipid production from starch wastewater by co-culture of anaerobic sludge and oleaginous microalgae with simultaneous COD , nitrogen and phosphorus removal. **Water Research**, v. 85, p. 404–412, 2015.

REZVANI, S.; MOHEIMANI, N. R.; BAHRI, P. A. Techno-economic assessment of CO₂ bio-fixation using microalgae in connection with three different state-of-the-art power plants. **Computers and Chemical Engineering**, v. 84, p. 290–301, 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**, v. 44, p. 20–36, 2015.

SANTANA, H. **Isolamento, Seleção E Caracterização De Microalgas Com Alta Produtividade De Biomassa Em Meio De Cultivo A Base De Vinhaça E CO₂**, 2016. 120f. Dissertação - Universidade Federal da Bahia.Vitória da Conquista/BA

SINGH, R. N.; SHARMA, S. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2347–2353, 2012.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, n. 0, p. 29–38, 2013.

SOLIMENO, A.; SAMSÓ, R.; UGGETTI, E.; et al. New mechanistic model to simulate microalgae growth. **ALGAL**, v. 12, p. 350–358, 2015.

SONG, C.; LIU, Q.; JI, N.; et al. Evaluation of hydrolysis – esterification biodiesel production from wet microalgae. , v. 214, p. 747–754, 2016.

SOUSA, F. A.; CAMPOS, A. T.; SILVA, E. D. B.; et al. Pollution potential reducing of swine manure in stabilization ponds in series. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 65–73, 2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

SUN, Y.; HUANG, Y.; LIAO, Q.; FU, Q.; ZHU, X. Enhancement of microalgae production by embedding hollow light guides to a flat-plate photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 207, p. 31–38, 2016.

SWARNALATHA, G. V.; HEGDE, N. S.; CHAUHAN, V. S.; SARADA, R. The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity , growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae. **ALGAL**, v. 9, p. 151–159, 2015.

TALEB, A.; KANDILIAN, R.; TOUCHARD, R.; et al. Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 480–490, 2016.

VILCHEZ, C.; VEGA, J. M. Nitrite uptake by immobilized *Chlamydomonas-reinhardtii* cells growing in airlift reactors. , v. 0229, n. 94, p. 386–390, 1995.

VILLAY, A.; LAROCHE, C.; RORIZ, D.; et al. Optimisation of culture parameters for exopolysaccharides production by the microalga *Rhodella violacea*. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 732–735, 2013.

WANG, Y.; HALLENBECK, P. C.; LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HUO, D. Growth and lipid accumulation of indigenous algal strains under photoautotrophic and mixotrophic modes at low temperature. **ALGAL**, v. 16, p. 195–200, 2016.

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

XIA, L.; GE, H.; ZHOU, X.; ZHANG, D.; HU, C. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 261–267, 2013.

YANG, Z.; NINNO, M.; WEN, Z.; HU, H. An experimental investigation on the multiphase flows and turbulent mixing in a flat-panel photobioreactor for algae cultivation. **Journal of Applied Phycology**, 2014.

ANEXO

COMPOSIÇÃO DO MEIO BBM MODIFICADO

| Solução estoque | Composição | g/L de água destilada | |
|--|--|-----------------------|---|
| 1 | NaNO ₃ | 25 g | |
| 2 | CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,5 g | |
| 3 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 7,5 g | |
| 4 | K ₂ HPO ₄ | 7,5 g | |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 17,5 g | |
| 6 | NaCl | 2,5 g | |
| 7 | EDTA | 50 g | |
| | KOH | 31 g | |
| 8 | FeSO ₄ .7H ₂ O | 4,98 g | |
| | H ₂ SO ₄ | 1,0 mL | |
| 9 | H ₃ BO ₃ | 11,42 g | |
| 10 Micronutrientes | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,82 g | Adicionar todos os componentes a 800 mL de dH ₂ O e dissolver entre cada adição. Depois completar para 1L. |
| | MnSO ₄ | 1,23 g | |
| | MoNaSO ₄ .2H ₂ O | 1,19 g | |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 1,57 g | |
| | Cl ₂ Co.6H ₂ O | 0,40 g | |
| <p>Armazenar soluções estoque na geladeira (4°C)</p> <p>Para preparo do meio BBM</p> <p>Adicionar 10 mL das soluções 1 – 6 a 940 mL de água destilada</p> <p>Adicionar 1 mL das soluções estoque 7 – 10</p> <p>Ajustar o pH para 7,1</p> <p>Autoclavar solução a 121°C (1 atm por 15 minutos)</p> | | | |