

## II-427 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO TÉRMICO E DA PRESENÇA DE NUTRIENTES NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL COMERCIAL VISANDO A PRODUÇÃO DE METANO

**Carlos Murilo de Melo Filho**<sup>(1)</sup>

Engenheiro Agrícola e Ambiental pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Mestrando em Engenharia Civil pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

**Larissa Ribeiro Martins**<sup>(2)</sup>

Bióloga pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB). Mestre e doutoranda em Engenharia Civil pela UFPE.

**Sávia Gavazza**<sup>(3)</sup>

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutorado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). Professora Associada da UFPE. Pós-doutorado na Universidade de Cornell (EUA) e Universidade de Toronto (Canadá).

**Mario Takayuki Kato**<sup>(4)</sup>

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professor Titular da UFPE.

**Lourdinha Florencio**<sup>(5)</sup>

Engenheira Civil pela UFPE. Mestrado em Engenharia Civil (Hidráulica e Saneamento) pela EESC-USP. Doutorado em Tecnologia Ambiental e Ciências da Agricultura pela Universidade de Wageningen (Holanda). Professora Titular da UFPE.

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Laboratório de Saneamento Ambiental da UFPE. Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n. Cidade Universitária. CEP: 50740-530. Recife PE. E-mail: [carlos.melofilho@hotmail.com](mailto:carlos.melofilho@hotmail.com); [flor@ufpe.br](mailto:flor@ufpe.br).

### RESUMO

Neste estudo foi investigada a biodegradabilidade da biomassa de *Chlorella sp.* a partir da indução por pré-tratamento térmico por autoclavagem e suplementação de macro e micronutrientes, com fins de produção de metano. A solubilização mais significativa da biomassa de microalgas sobreveio com tempo de exposição de 40 minutos, pressão de 1 kgf/cm<sup>2</sup> e 120 °C de temperatura, com valor médio de 47%. O maior rendimento de CH<sub>4</sub> foi observado no ensaio com substrato de alga *in-natura* em que o meio foi extra suplementado com mais nutrientes, resultando em 537 mL CH<sub>4</sub>/g SSV, 158% superior ao do mesmo ensaio utilizando alga sem pré-tratamento e sem adição de nutrientes. A menor produção foi observada no reator com alga autoclavada que não recebeu adição de nutrientes, cerca de 178 mL CH<sub>4</sub>/g SSV. O pré-tratamento por autoclavagem não teve influência significativa sobre os rendimentos finais de CH<sub>4</sub>. A biodegradabilidade da biomassa de *Chlorella sp.*, dentre todos os ensaios conduzidos, esteve em um intervalo de 18-56%, com destaques positivos para os reatores que receberam aporte de nutrientes. As concentrações finais de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram superiores às iniciais, com valores próximos aos 200 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L. No entanto, houve uma redução significativa de 97% da DQO bruta e de 76% da DQO solúvel, dentre todos os ensaios anaeróbios representados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Chlorella sp.*, Autoclavagem, Ensaio de biodegradabilidade, Solubilização, Amônia.

### INTRODUÇÃO

Durante os últimos anos, micro-organismos fotossintéticos como as microalgas vem recebendo especial atenção por despontarem como matéria-prima potencial para compor a gama de combustíveis da terceira geração, aqueles provenientes de culturas não alimentares (MUSSGNUM et al, 2010).

Além de serem altamente ricas energeticamente em termos de composição celular, abundante em proteínas, lipídios e carboidratos, as microalgas são capazes de originar grandes quantidades de biomassa mais eficientemente que culturas terrestres (SHILTON e GUIEYESSE, 2010). A produção de microalgas para fins de biocombustíveis inclui diferentes bioprodutos como hidrogênio, biodiesel e metano. O grande desafio da digestão anaeróbia de microalgas para fins de metano se refere à resistência da parede celular, que é geralmente um dos fatores limitantes à digestibilidade da biomassa (CHEN, 1987; AFI et al, 1996; CHEN e OSWALD, 1998).

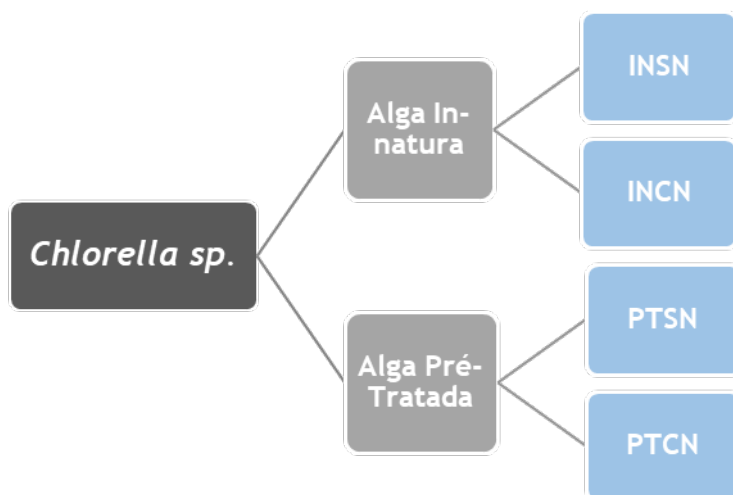
Contudo, estudos têm demonstrado uma correlação linear entre a solubilização da biomassa de microalgas e a produção de metano após aplicação de técnicas de pré-tratamento térmico (MENDEZ et al, 2013; PASSOS et al, 2013; MENDEZ et al, 2014).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do pré-tratamento térmico na solubilização de biomassa microalgal comercial e da presença de macro e micronutrientes na digestão anaeróbia de *Chlorella sp.*, visando a produção de metano, e investigando se os nutrientes exigidos pela microflora anaeróbia poderiam ser supridos pela composição das microalgas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Instalação experimental

Os testes tiveram como objetivo principal avaliar a biodegradabilidade metanogênica da biomassa comercial de *Chlorella sp.* e foram realizados no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da UFPE, a partir de 4 condições distintas, em termos de adição ou não de nutrientes, e indução ou não a pré-tratamento térmico de autoclavagem para lise celular, conforme Figura 1. Foram utilizadas garrafas reatores de boro-silicato de 500 ml (em triplicata) que funcionaram em batelada com alimentação única e com *headspace* de 10% do volume útil. O rendimento de metano foi testado na faixa mesofílica com temperatura de 30°C, carga de biomassa algal de 2 g SSV/L, relação Substrato/Inóculo (S:I) de 0.5 g DQO/g SSV, e tempo de experimento de 33 dias. A produção do gás foi monitorada através do deslocamento de líquido (solução de hidróxido de sódio 3%), que permite a quantificação direta do volume de CH<sub>4</sub> produzido diariamente. Cada reator de 500 mL esteve conectado por um sistema agulha-mangueira-agulha à uma garrafa invertida de 1 L contendo uma solução de NaOH 3%, que lavava o biogás produzido, retendo o CO<sub>2</sub> e permitindo apenas a passagem do gás metano (AQUINO et al 2007; ESPOSITO et al, 2012). O volume de metano foi quantificado a partir do volume de solução de NaOH 3% eliminado da garrafa e capturado por um frasco plástico de 1 L (Figura 2). Para avaliação da produção de metano realizada pela respiração endógena foram preparados reatores (em duplicata) como controles positivos (apenas inóculo) e controles negativos (alga *in-natura* e alga pré-tratada). Os valores de produção obtidos nos reatores contendo apenas o inóculo foram subtraídos dos obtidos nos reatores experimentais para obtenção do rendimento líquido corrigido para cada condição testada.



**Figura 1: Configuração dos experimentos realizados para avaliação da biodegradabilidade metanogênica de *Chlorella sp.***

Legenda: INSN (alga *in-natura* digerida sem adição de nutrientes); INCN (alga *in-natura* digerida com adição de nutrientes); PTSN (alga pré-tratada digerida sem adição de nutrientes); PTCN (alga pré-tratada digerida com adição de nutrientes).



**Figura 2: Aparato experimental para monitoramento da produção diária de CH<sub>4</sub>**

Fonte: Próprio autor

### **Suspensão de Algas *In-natura***

As microalgas da espécie *Chlorella sp.* foram obtidas comercialmente em sua forma liofilizada. A biodegradabilidade anaeróbia dessa espécie, com finalidade de produção de metano, tem sido objeto de estudo de diversos autores, devido à sua composição celular rica em carboidratos e proteínas (MENDEZ et al, 2014). Uma suspensão de *Chlorella sp.* de concentração 3 g/L foi preparada a partir da biomassa desidratada obtida. Esta solução recebeu agitação com velocidade constante por 20 minutos com finalidade de solubilização inicial e homogeneização da biomassa, sendo ao fim deste procedimento, identificada como a biomassa algal *in-natura* sem pré-tratamento.



**Figura 3: Biomassa seca de *Chlorella sp.* comercial liofilizada**

Fonte: Próprio autor

### **Pré-Tratamento da Biomassa de Algas**

O pré-tratamento térmico da biomassa algal *in-natura* foi conduzido em garrafas de boro-silicato com volume total de 1 L contendo a solução de suspensão de algas, as quais foram arranjadas (em triplicata) em autoclave vertical (marca Phoenix, linha 50 Litros) à temperatura de 120 °C, tempo de exposição de 40 minutos, pressão de 1 kgf/cm<sup>2</sup> com queda brusca ao fim do tempo de exposição. A seleção do tempo de exposição e da temperatura do pré-tratamento de autoclavagem foi resultado de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> em duplicata (total de 8 ensaios), cujas respostas foram o aumento da concentração (mg/L) de DQO solúvel na suspensão de *Chlorella sp.* (Tabela 3).

### Inóculo

O lodo metanogênico, obtido a partir de reator UASB de estação de tratamento de efluentes de uma indústria cervejeira, foi aclimatado à 30 °C por 48 horas (SURESH et al, 2013) e não foi adaptado à biomassa de microalgas antes do início do teste (SCHWEDE et al, 2013). Sua caracterização consistiu da determinação do teor de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), conforme APHA (2012).

### Nutrientes

AQUINO et al, (2007) argumentam que a solução de nutrientes ideal deve conter macro e microelementos essenciais, bem como alcalinidade e agente redutor, não havendo um consenso na literatura em relação à solução nutricional padrão a ser utilizada em ensaios anaeróbios. Para tanto, a solução para suplementação por metais e nutrientes utilizada neste estudo segue as concentrações propostas por FLORENCIO (1993) e podem ser observadas na Tabela 1.

**Tabela 1: Concentração de reagentes em solução de nutrientes**

SOLUÇÃO	REAGENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Macronutrientes	NH <sub>4</sub> Cl	0,280
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,252
	MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,100
	CaCl <sub>2</sub>	0,007
	NaHCO <sub>3</sub>	0,400
	Extrato de levedura	0,100
Micronutrientes	FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,000
	ZnCl <sub>2</sub>	0,050
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,500
	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,142
	NaSeO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,164
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,050
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,038
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,000
	AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,090
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> .Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,050
	EDTA	1,000
	Resazurina	0,200
	HCl	1,000 (ml\L)

Fonte: FLORENCIO (1993)

### Métodos Analíticos

Os métodos analíticos conduzidos tiveram como objetivo caracterizar a suspensão de biomassa algal *in-natura*, pós-tratamento térmico por autoclavagem, e efluente da digestão, e foram realizados de acordo com o *Standard Methods* (APHA, 2012), conforme identificado na Tabela 2.

**Tabela 2: Parâmetros e respectivos métodos analíticos realizados na caracterização da suspensão de biomassa algal *in-natura* e pós tratamento térmico**

ANÁLISES	UNIDADE	MÉTODOS ANALÍTICOS
Sólidos Totais Voláteis	mg ST/L	Gravimétrico
Sólidos Suspensos Voláteis	mg SSV /L	Gravimétrico
pH	---	Eletrométrico
Sulfato	mg/L	Cromatográfico
DQO (total e filtrada)	mg O <sub>2</sub> /L	Colorimétrico
Nitrogênio Total	mg N-NTK/L	Macro-Kjedhal
Nitrogênio Amoniacal	mg N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /L	Titulométrico
Ácidos Graxos Voláteis	mg AGV/L	Cromatográfico
Alcalinidade	mg CaCO <sub>3</sub> /L	Potenciométrico
Condutividade Elétrica	μS/cm	Condutivímetro
Salinidade	‰	Condutivímetro
Sódio, Potássio, Cálcio	mg/L	Fotometria de chama

Fonte: Próprio autor

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Otimização do Pré-Tratamento Térmico

Os ensaios prévios de autoclavagem tiveram como objetivo selecionar o tempo de exposição e a temperatura adequados que promovessem a hidrólise da parede celular microalgal aumentando a DQO solúvel. Na Tabela 3, encontram-se os níveis de trabalho e as respostas, em termos de aumento percentual de DQO solúvel (mg/L) do planejamento fatorial multivariado empregado.

**Tabela 3: Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para seleção das condições do pré-tratamento de autoclavagem**

Variável	Nível (-1)		Nível (+1)	
Tempo	30 min		40 min	
Temperatura	111°C		120°C	
Ensaio	Níveis		Resposta	
	Tempo	Temperatura	mg DQOs/L	Aumento (%)
1	-1	-1	572	14
2	-1	+1	633	25
3	+1	-1	697	37
4	+1	+1	753	48
1	-1	-1	568	12
2	-1	+1	640	26
3	+1	-1	707	39
4	+1	+1	761	50

Fonte: Próprio autor

Diante das condições estudadas, foi possível concluir que o melhor desempenho referente ao aumento da solubilização da matéria orgânica foi observado para os dois níveis positivos do planejamento, tempo de 40 minutos e temperatura de 120 °C, representando um aumento médio da DQO solúvel de 49%. Portanto, estes valores foram pré-selecionados para as condições de pré-tratamento da fase experimental do estudo.

### Efeitos do Pré-Tratamento Térmico e Caracterização da Biomassa de Microalgas

Visando o aumento da disponibilidade de material orgânico ao consórcio bacteriano por meio do aumento da DQO solúvel e o potencial de produção de CH<sub>4</sub> a partir da digestão de *Chlorella sp.* comercial, o pré-tratamento foi aplicado à biomassa de microalgas. Além do aumento significativo de 507±1 mg/L para 752±9 mg/L da DQO solúvel na suspensão de microalgas após autoclavagem, foram observados também aumentos nas concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e ácidos graxos voláteis (AGVs). Em parte, isso pode ser atribuído à liberação do conteúdo orgânico para o meio aquoso, em razão do aumento da temperatura e pressão. Ademais, houve um aumento do teor de sólidos dissolvidos totais (SDT) e dos sólidos totais voláteis (STV) da biomassa autoclavada em relação à biomassa *in-natura* (Tabela 4); justifica-se assim o alto grau de solubilização, da



ordem de 47%, obtido por essa suspensão de microalgas. Esses valores estão em concordância com o que foi evidenciado por MENDEZ et al. (2013) que conduziram experimentos de digestão de *Chlorella sp.* e pré-tratamento para lise celular também por autoclavagem.

**Tabela 4: Caracterização da suspensão de biomassa de *Chlorella sp. in-natura* e pré-tratada**

Parâmetro	Alga <i>In-natura</i>	Alga Pré-Tratada
pH	6,4 ± 0,2	6,2 ± 0,2
Sólidos Totais Voláteis (g/L)	2,40	2,50
Sólidos Dissolvidos Totais (g/L)	0,38	0,59
DQO total (g/L)	5,9 ± 0,3	6,3 ± 0,2
DQO filtrada (g/L)	0,5±0,0	0,7±0,01
NTK (mg/L)	37,8 ± 0,2	37,9 ± 0,3
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	8,5 ± 0,4	9,1 ± 0,6
Sulfato (mg/L)	12,6 ± 0,9	13,4 ± 0,7
AGV (mg/L)	19,3	23,4
CE (µS/cm)	158	273
Salinidade (‰)	0,08	0,11
Na <sup>+</sup> (mg/L)	16,5	17,9
K <sup>+</sup> (mg/L)	14,9	14,7
Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	4,1	4,3

Fonte: Próprio Autor

#### Parâmetros Operacionais dos Reatores

Os reatores INCN e PTCN apresentaram concentrações iniciais de DQO solúvel iguais a 608±4 mg/L e 902±2mg/L, respectivamente. Esses valores são maiores que os observados nos reatores INSN e PTSN (respectivas versões sem adição de nutrientes), devido à suplementação com macro e micro elementos aos ensaios que objetivaram investigar o desempenho do consórcio bacteriano nessas condições durante a digestão da biomassa de microalgas. Pelo mesmo motivo, houve um aumento médio de quase 2x das concentrações de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas versões dos reatores que receberam suplementação. No entanto, essas concentrações mantiveram-se num intervalo abaixo de 18 mg/L, não representando assim, níveis de efeitos inibidores à produção de biogás. O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> só tem efeito inibidor às bactérias metanogênicas quando presente em concentrações superiores a 3000 mg/L, inibindo a enzima sintetizadora de CH<sub>4</sub> e difundindo-se passivamente nas células das metanogênicas provocando desequilíbrio de prótons e deficiência de potássio (PARKIN et al., 1986).

As relações DQO:N observadas no início do experimento variaram entre 13:1 para os reatores com substrato *in-natura* (INSN e INCN), e 20:1 nos reatores com substrato pré-tratado (PTSN e PTCN), respectivamente. De acordo com Brune e Yen et al. (2007), esses valores encontram-se praticamente dentro de uma faixa ótima de equilíbrio entre os requisitos de C e N para o consórcio bacteriano. Valores muito acima ou muito abaixo de uma relação DQO:N, variável entre 20:1 e 30:1, são considerados inibitórios ao processo de digestão em decorrência da liberação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e acúmulo de ácidos orgânicos, os quais são inibidores ao processo fermentativo quando presentes em altas concentrações (PARKIN et al., 1986).

Embora tenha ocorrido um aumento da condutividade elétrica entre as suspensões de algas, é possível observar que, tanto para os ensaios com algas *in-natura* como fonte de substrato, quanto para os ensaios com algas pré-tratadas, os teores de sais foram baixos. Uma grande preocupação durante a digestão anaeróbia de biomassa algal, são os efeitos da salinidade e da concentração de Na<sup>+</sup> às bactérias metanogênicas. A salinidade causa a desidratação das células bacterianas devido ao aumento da pressão osmótica (CHENG et al., 2008), mas isso pode variar de acordo com o ambiente associado. Face às concentrações reduzidas de Na<sup>+</sup> presentes nas soluções de algas e as baixas quantidades adicionadas a partir da suplementação com nutrientes, não foram observados níveis tóxicos desse elemento à digestão desses substratos durante a realização do estudo. De qualquer maneira, não há uma definição clara na literatura sobre uma faixa de concentração em que o Na<sup>+</sup> se torna ou não de fato inibitório às arqueas metanogênicas.

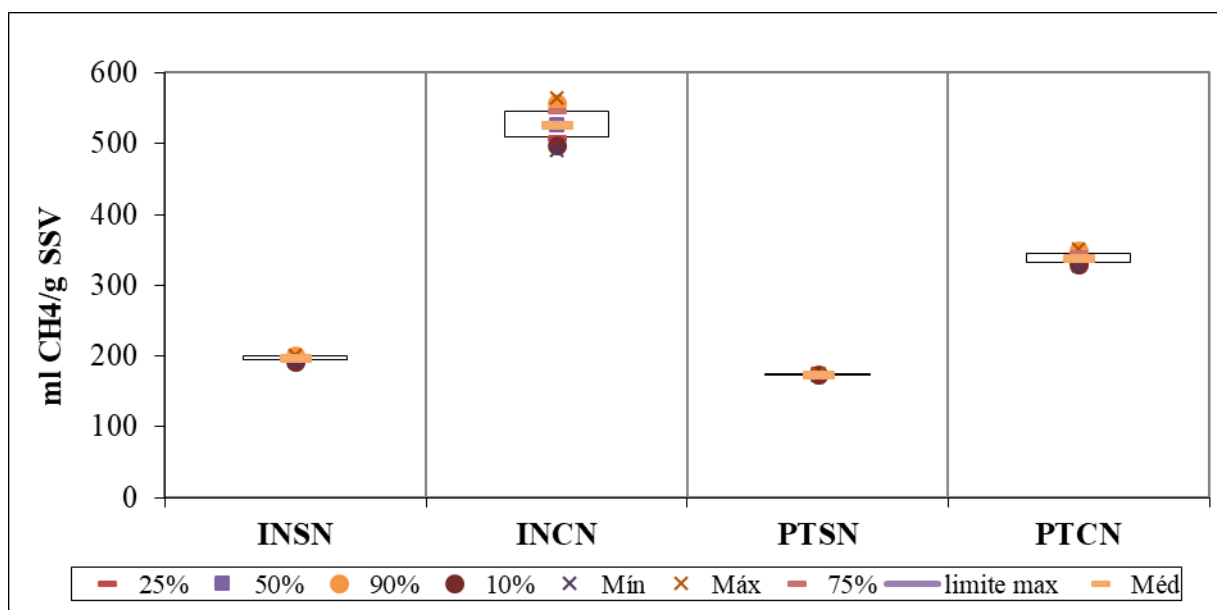
As relações DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> observadas no início do experimento mantiveram-se na faixa média de 44:1 para os ensaios com substrato de algas *in-natura*, e 61:1 para os ensaios com substrato autoclavado. Essas razões são consideradas favoráveis à fermentação pelas bactérias metanogênicas, uma vez que a extrema competição com

as bactérias redutoras de sulfato (BRS) comoceptor de elétrons, acontece em relações DQO/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> de 1,7-2,7. O aumento dessas proporções favorece às metanogênicas e a redução favorece às BRS (BITTON, 1994; METCALF e EDDY, 2006).

### Produção de Gás Metano e Biodegradabilidade

A descontinuidade da produção de CH<sub>4</sub> ocorreu aos 33 dias de tempo de experimento, permitindo concluir que o maior rendimento de metano dentre os reatores foi observado partir da digestão metanogênica da biomassa *in-natura* de *Chlorella sp.*, que recebeu a suplementação por nutrientes (Reator INCN). O menor rendimento de CH<sub>4</sub> foi observado a partir da digestão da biomassa pré-tratada sem adição de nutrientes (Reator PTSN). O reator INCN obteve um rendimento médio da ordem de 537 ml CH<sub>4</sub>/g SSV enquanto que os dos reatores PTCN, INSN e PTSN foram de 353 ml CH<sub>4</sub>/g SSV, 208 ml CH<sub>4</sub>/g SSV e 178 ml CH<sub>4</sub>/g SSV, respectivamente (Figura 4).

As maiores produções de CH<sub>4</sub> eram esperadas nos ensaios que receberam os substratos de microalgas pré-tratadas, o que parcialmente não aconteceu. No confrontamento dos rendimentos de biogás entre os reatores INSN e PTSN, pode-se concluir que não houve de fato diferença significativa entre suas respectivas produções. A explicação para esse fato é que, conforme argumentado por Uduman et al. (2010), o processo de recuperação e purificação da biomassa de microalgas envolve uma série de operações unitárias. Uma delas é a floculação, onde produtos químicos, classificados como agentes de floculação, são usualmente adicionados ao meio aquoso para formar agregados de algas de grandes dimensões. Os agentes floculantes são ricos em sais metálicos, e como relatado por Papazi, Makridis e Divanach (2010), estes sais ocasionam a lise celular. Desta forma, pode-se concluir que a lise das células já teria acontecido ainda em campo durante o processo de beneficiamento dessa biomassa para fins comerciais, e não, necessariamente, no transcórre do processo de autoclavagem preliminar às fases experimentais deste estudo.



**Figura 4: Rendimento de CH<sub>4</sub> na digestão anaeróbica de *Chlorella sp.* comercial (S/I: 0.5)**

*Legenda: INSN (alga in-natura digerida sem adição de nutrientes); INCN (alga in-natura digerida com adição de nutrientes); PTSN (alga pré-tratada digerida sem adição de nutrientes); PTCN (alga pré-tratada digerida com adição de nutrientes).*

No que se refere aos ensaios suplementados com nutrientes (INCN e PTCN), estes apresentaram dentre todos os ensaios, os rendimentos de CH<sub>4</sub> mais significativos. A justificativa para este fato é que, possivelmente a biomassa comercial de *Chlorella sp.* tenha perdido parte de seu teor de nutrientes durante o processo de liofilização; ou ainda que estes não se apresentaram em concentrações aceitáveis em sua composição exigidas pela microflora anaeróbica, mas que foram supridas a partir da adição de macro e micronutrientes, favorecendo o desempenho desses micro-organismos nos reatores com meio enriquecido.

O déficit de produção de biogás do reator PTCN em relação ao reator INCN foi investigado a partir da hipótese de que durante o processo de autoclavagem, substâncias recalcitrantes ou tóxicas ao metabolismo metanogênico acabaram sendo geradas devido à elevada temperatura e pressão, conforme apontam estudos de Wilson e Novak (2009), sendo assim inibidoras ao processo de biometanização. Para tanto, análises de cromatografia por de coluna líquida foram realizadas na caracterização da biomassa de microalgas pré-tratada com o objetivo de averiguar a presença de compostos tóxicos, como o hidroximetil furfural. De acordo com Pires (2013), o hidroximetil furfural é um composto tóxico potencialmente formado durante processos de alta temperatura e pressão. No entanto, os resultados obtidos a partir das análises cromatográficas não identificaram compostos furfural nas amostras de biomassa algal autoclavadas. Desta forma, testes adicionais de caracterização dessa biomassa devem ser realizados, a fim de investigar se outros compostos tóxicos foram possivelmente formados atuando como dificultadores ou inibidores parciais do processo de biometanização, ou se ainda outra fonte inibitória alheia ao processo não foi considerada no escopo deste estudo

Os rendimentos de  $\text{CH}_4$  em todos os ensaios se apresentaram em concordância com estudos anteriores que também investigaram a digestão de *Chlorella* em meios anaeróbios. Lu et al. (2013) obtiveram rendimento máximo de 403 ml  $\text{CH}_4/\text{g SSV}$  na digestão de *Chlorella vulgaris* utilizando técnicas de bioaugmentação, diversificando a flora bacteriana e aumentando a eficiência de fermentação. Já Ras et al. (2013) e Polakovicova et al. (2012), alcançaram produções de 240 ml  $\text{CH}_4/\text{g SSV}$  e 189 ml  $\text{CH}_4/\text{g SSV}$ , respectivamente, investigando também a biometanização a partir da digestão de *Chlorella vulgaris*, utilizando processos integrados de produção e digestão de microalgas em escala experimental.

As máximas produções diárias de  $\text{CH}_4$  (g DQO/g SSV.d) também foram alcançadas pelos reatores com aporte de nutrientes, enquanto que os reatores sem suplementação extra apresentaram similarmente a menor produção específica. A atividade metanogênica específica (AME) média para os reatores INCN e PTCN foram 0,12 g DQO/g SSV.d e 0,08 g DQO/g SSV.d, respectivamente. Enquanto que os reatores INSN e PTSN apresentaram AME igual a 0,5 g DQO/g SSV.d. A dinâmica da produção acumulada de  $\text{CH}_4$  nos ensaios anaeróbios deste estudo está apresentada nas Figura 5 e 6.

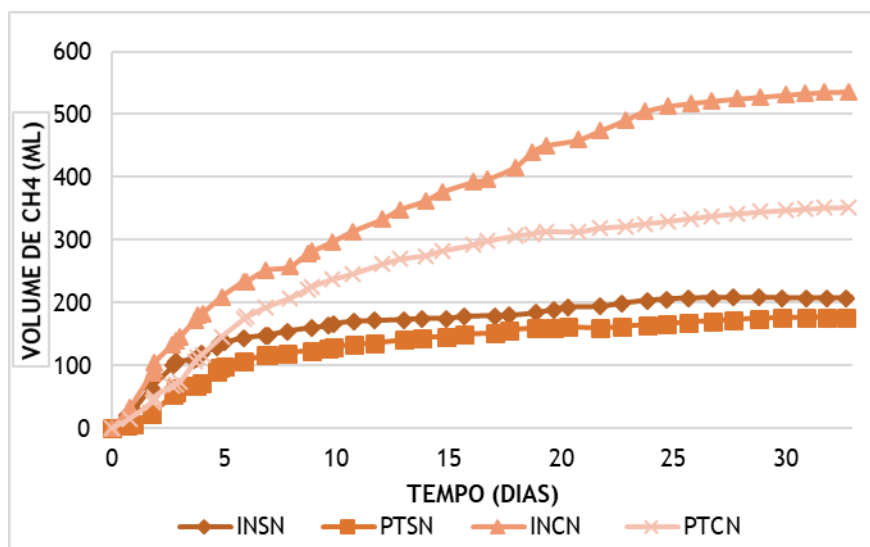
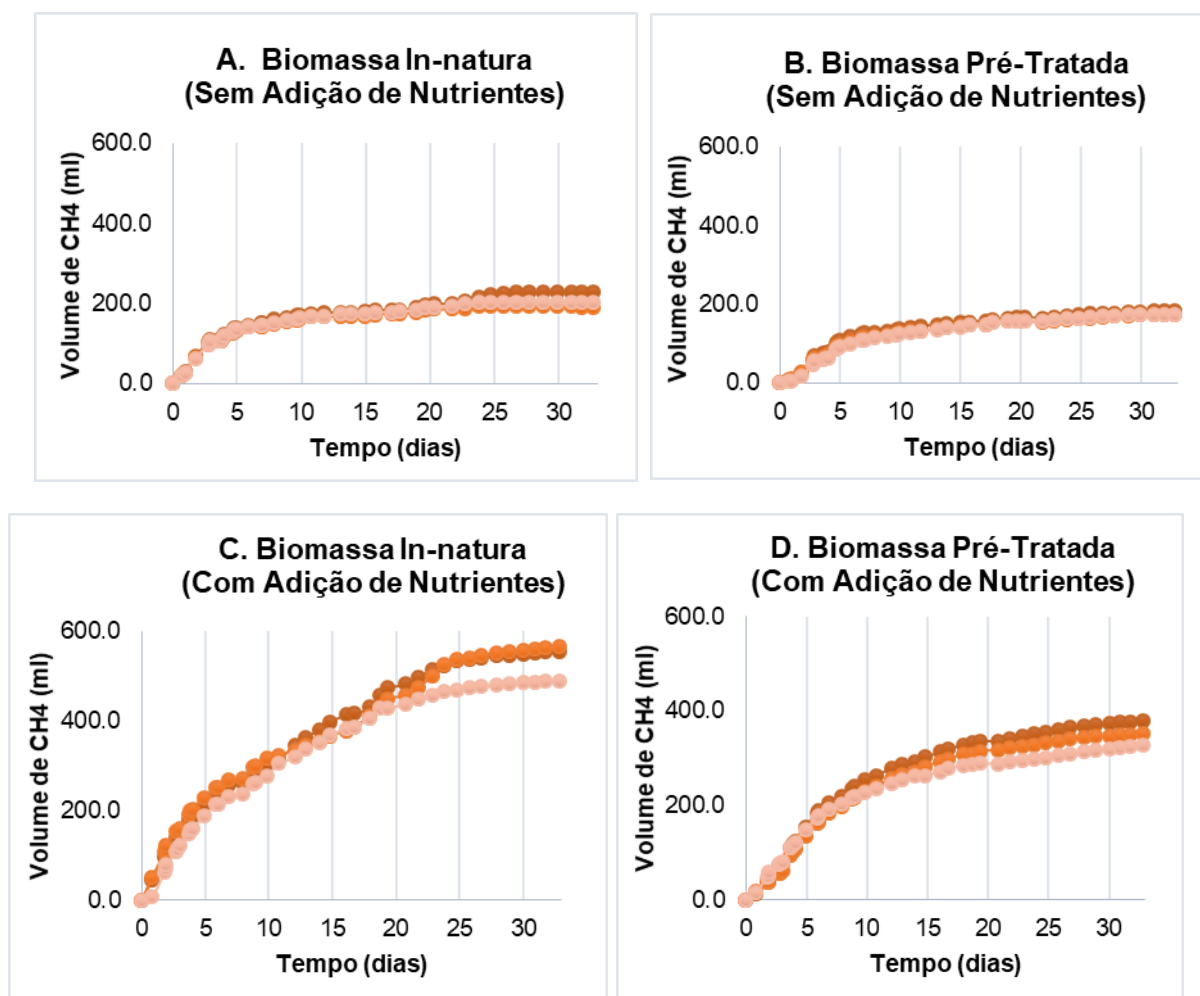


Figura 5: Produção acumulada de  $\text{CH}_4$  na digestão anaeróbia de *Chlorella sp.* comercial (S/I: 0.5)

Fonte: Próprio Autor





**Figura 6: Produções Diárias Acumuladas de CH<sub>4</sub> a partir da Digestão Anaeróbia de *Chlorella sp.* Comercial (S/I: 0.5)**

Fonte: Próprio Autor

Os percentuais de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa de *Chlorella sp.* nos experimentos testados estão apresentados na Tabela 5. Quase 2/3 da biomassa *in-natura* utilizada como substrato no reator INCN foi convertida a metano, onde a microflora anaeróbia foi favorecida com a suplementação de nutrientes. A digestão dessa biomassa foi quase 3 vezes superior àquela observada no reator PTSN, e este, por sua vez, apresentou metade da degradação biológica observada no reator PTCN. Deste modo, é possível concluir que o meio suplementado foi de fato um fator limitante à digestibilidade anaeróbia do substrato algal, estando em concordância com os potenciais de produção de CH<sub>4</sub> apresentados nos ensaios através de uma correlação linear.

**Tabela 5: Biodegradabilidade Anaeróbia dos Ensaio de Digestão de *Chlorella sp.***

Ensaio	Biodegradabilidade Anaeróbia (%)
INSN	21,8 ± 1,4
INCN	56,3 ± 3,3
PTSN	18,1 ± 0,4
PTCN	37,3 ± 1,8

Fonte: Próprio Autor

### Efluente da Digestão

As concentrações de nitrogênio na forma iônica ( $\text{NH}_4^+$ ) no efluente da digestão foram superiores às concentrações observadas durante o início do experimento. As maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  foram observadas nos ensaios PTCN e INCN, com teores de 230 mg  $\text{NH}_4^+$ /L e 265 mg  $\text{NH}_4^+$ /L, respectivamente. Chen et al. (2008) argumentam que  $\text{NH}_4^+$  é naturalmente produzido a partir da decomposição biológica de matéria nitrogenada, principalmente sob a forma de proteínas. Deste modo, os reatores que apresentaram maiores percentuais de biodegradabilidade da biomassa e de produção de  $\text{CH}_4$  naturalmente apresentarão maiores concentrações de  $\text{NH}_4^+$  no sobrenadante da digestão, visto que a microflora anaeróbia atuou mais ativamente nas reações de síntese e produção de metabólitos. SIALVE et al. (2009) destacam que, quanto maior a concentração de proteínas na composição bioquímica da espécie digerida, maior será a liberação de amônia no meio aquoso; *Chlorella* é uma espécie microalgal que tipicamente apresenta alto conteúdo de proteínas em sua composição.

O pH do sobrenadante da digestão apresentou-se dentro da faixa ótima para os micro-organismos metanogênicos em todos os ensaios estudados, tendo valores médios de  $6,9 \pm 0,01$  nos reatores INSN e PTSN, e  $7,4 \pm 0,01$  nos reatores INCN e PTCN. Valores superiores a 8,3 e inferiores a 6,0 são altamente prejudiciais às metanogênicas, devendo ser evitados (CHERNICHARO, 1997). Além do pH, outros parâmetros físico-químicos como alcalinidade e AGVs foram avaliados com o objetivo de investigar o equilíbrio do sistema. A Tabela 6 apresenta os valores médios de alcalinidade total e ácidos orgânicos, bem como as relações AGV/Alcalinidade finais do experimento.

**Tabela 6: Valores médios de alcalinidade, AGV e relação AGV/ALC**

Ensaio	Alcalinidade Total (mg/L)	Ácidos Graxos Voláteis (mg/L)	AGV/ALC
INSN	95,86	10,30	0,107
INCN	461,79	2,80	0,006
PTSN	74,73	15,20	0,203
PTCN	433,12	3,30	0,007

Fonte: Próprio Autor

A relação AGV/ALC funciona como um indicador da estabilidade dos reatores anaeróbios, e a partir da análise desses dados, observa-se que todos os reatores apresentaram valores inferiores a 0,3, indicando que a conversão de AGV a metano se dava na mesma proporção em que esses ácidos eram produzidos. Quanto mais próxima de zero é essa relação, maior é a estabilidade do reator anaeróbio (AHRING et al., 1995; WANG et al. 2001).

A remoção de DQO também foi contemplada no escopo deste estudo, e conforme ilustra a Tabela 7, houve uma redução significativa deste parâmetro entre o estágio inicial e final do processo de digestão. As maiores reduções de DQO bruta foram observadas nos reatores PTCN e PTSN, 98% e 97%, respectivamente, apresentando concentrações médias de  $153 \pm 3$  mg/L e  $185 \pm 4$  mg/L. O mesmo se repetiu para as reduções de DQO solúvel. As maiores quedas foram identificadas nos reatores PTCN e PTSN, 85% e 78%, respectivamente, apresentando concentrações médias de  $134 \pm 3$  mg/L e  $164 \pm 5$  mg/L.

**Tabela 7. Concentrações Finais de DQO bruta e filtrada (mg/L) e Redução Percentual**

DQO Bruta				
	INSN	INCN	PTSN	PTCN
Concentração Final (mg/L)	$194 \pm 3$	$177 \pm 8$	$187 \pm 4$	$153 \pm 3$
Redução (%)	96,0	97,0	97,1	98,0
DQO Solúvel				
	INSN	INCN	PTSN	PTCN
Concentração Final (mg/L)	$175 \pm 1$	$154 \pm 8$	$164 \pm 5$	$134 \pm 3$
Redução (%)	65,4	74,7	78,2	85,2

Fonte: Próprio Autor

## CONCLUSÕES

Com base no estudo realizado, foi possível concluir que:

O melhor tempo de exposição e temperatura que promoveram a maior solubilidade da biomassa de *Chlorella sp.*, com aumento da DQO solúvel em 49%, foi observado no tempo de 40 minutos e temperatura de 120°C.

O pré-tratamento por autoclavagem se mostrou eficiente no que se refere ao aumento da solubilidade da biomassa autoclavada em relação à biomassa *in-natura*, sendo este da ordem de 47%, mas ineficiente no que se refere ao rendimento de CH<sub>4</sub> nos ensaios com biomassa autoclavada. A indução com pré-tratamento térmico proporcionou um relativo aumento nas concentrações de ácidos orgânicos e condutividade elétrica na biomassa autoclavada, no entanto, estes não se apresentaram em níveis considerados inibitórios.

Com boas relações DQO:N que variaram entre 13:1 e 20:1 e altas relações DQO:SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, além de parâmetros físico-químicos ajustados e fora da faixa de inibição à microflora anaeróbia, os reatores foram capazes de produzir em média 300 ml CH<sub>4</sub>/g SSV.

Os maiores rendimentos foram identificados nos reatores que receberam suplementação por nutrientes (INCN e PTCN), sendo estes iguais a 537 ml CH<sub>4</sub>/g SSV e 353 ml CH<sub>4</sub>/g SSV, respectivamente. Enquanto que os menores rendimentos foram observados nos reatores não extra suplementados (PTSN e INSN), apresentando valores iguais a 178 ml CH<sub>4</sub>/g SSV e 208 ml CH<sub>4</sub>/g SSV, respectivamente.

Os ensaios que apresentaram maior biodegradabilidade da biomassa microalgal também foram aqueles que receberam adição de macro e microelementos. Os percentuais de biodegradabilidade da biomassa de *Chlorella sp.* foram 56%, 36%, 22% e 18% referentes aos reatores INCN, PTCN, INSN e PTSN, respectivamente.

Houve uma redução significativa das concentrações finais de DQO bruta e solúvel no efluente da digestão. O reator PTCN alcançou uma redução de 98% da DQO bruta; e todos os demais reatores apresentaram reduções de DQO bruta superiores a 96%. Quanto à concentração da DQO solúvel, os menores valores foram obtidos nos reatores PTCN e INCN, mas em termos de redução percentual os maiores números foram observados nos reatores PTCN e PTSN, com reduções de 85% e 78%, respectivamente.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização das pesquisas neste tema aos pesquisadores do LSA-UFPE (projeto PRONEX/NUTREL); à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas. À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio ao projeto Rede Nacional de Tratamento de Esgotos Descentralizados (RENTED). À Companhia de Saneamento de Pernambuco (COMPESA) e BRK Ambiental pelo suporte aos trabalhos experimentais e coleta de amostras nas estações de tratamento de esgotos de Rio Formoso e Mangueira Recife.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFI L., et al. Bacterial degradation of green microalgae: incubation of *Chlorella emersonii* and *Chlorella vulgaris* with *Pseudomonas oleovorans* and *Flavobacterium aquatile*. Proceedings of the 17th International Meeting on Organic Geochemistry vol. 25(1–2): 1996. p. 117–30.
2. APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22<sup>a</sup> ed., Hardback: American Public Health Association, 2012.
3. AQUINO, Sérgio F. et al. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios. Eng. Sanit. Ambient., Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, jun, 2007.
4. BITTON, G., ed. Wastewater microbiology. 1 ed. Ecological and applied microbiology, ed. R. Mtchell. 1994, Wiley-liss: Florida. 478.
5. CHEN, P. Factors influencing methane fermentation of micro-algae. PhD thesis, University of California, Berkeley, CA, USA, 1987.
6. CHEN P., OSWALDJ. Thermochemical treatment for algal fermentation. Environ Int 1998; 24: 889–97.
7. CHENG, Y. et al., Inhibition of anaerobic digestion process: a review, Bioresour. Technol. 99 4044–4064. 2008.

8. CHERNICHARO, C. A. de L. Reatores Anaeróbios. 2a ed. Belo Horizonte - MG. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG, 380p. 1997.
9. ESPOSITO, G. et al. Bio-Methane Potential Tests to Measure The Biogas Production From The Digestion and Co-Digestion of Complex Organic Substrates. The Open Environmental Engineering Journal, 5, p.1-8, 2012.
10. FLORENCIO, L., et al. Effect of Cobalt on the Anaerobic Degradation of Methanol. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 75, n.5, p. 368-374, mar. 1993.
11. LU, F. et al. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae, Biotechnology for biofuels 6 (1) (2013) 92.
12. MENDEZ, L., et al., Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pre-treatments. Bioresour. Technol. 149, 136–141. 2013.
13. MENDEZ, L., et al. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus sp.* biomass at increasing biomass loads. Appl. Energy 129, 238–242. 2014.
14. METCALF, L. and H.P. Eddy, Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4th ed.,ed. G. Tchobanoglous, F.L. Burton, and H.D. Stensel. 2006, Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited: New York. 1819.
15. MUSSGNUG, J. et al., Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, J. Biotechnol. 150 (2010) 51–56.
16. PAPAZI, A; MAKRIDIS, P; DIVANACH, P; Harvesting *Chlorella Minutissima* Using Cell Coagulants. Journal of Applied Phycology, V. 22, n. 3, p. 349-355, 2010. ISSN 0921-8971
17. PARKIN, G.F., OWEN, W.F., Fundamentals of Anaerobic Digestion of Wastewater Sludges, J. Environ. Eng. 112. 867–920. 1986.
18. PASSOS, F.; GARCÍA, J.; FERRER, I. Impact of low temperature on the anaerobic digestion of microalgal biomass. Bioresource Technology. 138, 79-86, 2013.
19. PIRES, E. "Toxicidade do hidroximetilfurfural e thiametoxam para *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)." Dissertação de Mestrado. 2010.
20. POLAKOVICOVA, G. et al., Process integration of algae production and anaerobic digestion, Chem. Eng. Trans. 29 (2012) 1129–1134.
21. RAS, M. et al., Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*, Bioresour. Technol. 102 (1) (2010) 200–2006.
22. SCHWEDE, S. et al. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. Bioresource Technology, v. 143, p. 505–511, 2013.
23. SHILTON, A.; GUIEYESSE B., Sustainable sunlight to biogas is via marginal organics, Curr. Opin. Biotechnol. 21 (2010) 287–291.
24. SIALVE, B. et al., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. Biotechnol. Adv. 27, 409–416.
25. SURESH, A. et al. Improved volatile fatty acid and biomethane production from lipid removed microalgal residue (LRμAR) through pretreatment. Bioresource Technology, 149, p.590–594, 2013.
26. UDUMAN, N et al. Dewatering of Microalgal Cultures: A Major Bottleneck To Algae-Based Fuels. Journal of Renewable and Sustainable Energy, V. 2, n. 1, p. 012701, 2010. ISSN 1941-7012
27. WILSON, C.A., NOVAK, J.T., 2009. Hydrolysis of macromolecular components of primary and secondary wastewater sludge by thermal hydrolytic pretreatment. Water Res. 43, 4489–4498.
28. YEN, H.W., BRUNE, D.E., Anaerobic Co-Digestion of Algal Sludge and Waste Paper to produce methane, Bioresour. Technol. 98. 130–134. 2007.